

HEMMUNG DES INTESTINALEN METABOLISMUS VON DIBUTYLNITROSAMIN DURCH ETHANOL BEI DER RATTE

Jutta Neiss

Diss
~~Diss~~
München
1985

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. W. Forth

vorgelegt über: Prof. Dr. K. Tempel

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. W. Leidl

HEMMUNG DES INTESTINALEN METABOLISMUS VON DIBUTYLNITROSAMIN DURCH ETHANOL BEI DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Jutta Neiss
aus
Berlin

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. K. Tempel

Koreferent: Priv.Do. Dr. Dr. habil. H. Schmidt

Tag der Promotion: 26. Juli 1985

I.	Einleitung	1
II.	Die Entstehung der Sprache	10
III.	Die Entwicklung der Sprache	20
IV.	Die Funktion der Sprache	30
V.	Die Sprache und die Gesellschaft	40
VI.	Die Sprache und die Kultur	50
VII.	Die Sprache und die Wissenschaft	60
VIII.	Die Sprache und die Kunst	70
IX.	Die Sprache und die Philosophie	80
X.	Die Sprache und die Religion	90
XI.	Die Sprache und die Politik	100
XII.	Die Sprache und die Ethik	110
XIII.	Die Sprache und die Ökonomie	120
XIV.	Die Sprache und die Medizin	130
XV.	Die Sprache und die Psychologie	140
XVI.	Die Sprache und die Biologie	150
XVII.	Die Sprache und die Chemie	160
XVIII.	Die Sprache und die Physik	170
XIX.	Die Sprache und die Astronomie	180
XX.	Die Sprache und die Geographie	190
XXI.	Die Sprache und die Geschichte	200
XXII.	Die Sprache und die Zukunft	210

Meiner Mutter



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

Seite

A B K Ü R Z U N G E N	1
Anmerkungen	1
I. P R O B L E M S T E L L U N G	2
II. E I N L E I T U N G	3
1. Stoffwechsel von Ethanol	3
2. Wechselwirkungen von Ethanol mit anderen Stoffen	5
3. Wirkungen von akuter Alkoholaufnahme am Darm	6
4. Bedeutung des Darmes für die Biotransformation von Fremdstoffen	6
5. Vorkommen und toxikologische Bedeutung von Nitrosaminen	9
6. Wirkung und Stoffwechsel von Dibutylnitrosamin (NDBA)	11
III. E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N	15
1. Material	15
1.1. Reagenzien	15
1.1.1. Perfusion	15
1.1.2. Bestimmung der Vitalitätskriterien	16
1.1.3. Analytik	16
1.2. Geräte	17
1.2.1. Perfusion	17
1.2.2. Bestimmung der Vitalitätskriterien	17
1.2.3. Analytik	17
2. Methodik	20
2.1. Beschreibung der Versuchsanordnung	20
2.2. Untersuchungen über mögliche Verbesserungen der Methodik	22
2.2.1. Kontamination des Darmes von außen	22
2.2.2. Problem des gasdichten Verschlusses der unteren Kammer	22

	Seite
2.2.3. Einführung der separaten Belüftung für die untere Kammer	23
2.2.4. Versuch mit einer oberen Waschflasche	24
2.2.5. Einführung von Sep Pak	25
2.2.6. Versuche mit anderen Lösungsmitteln anstelle von Butanol	25
2.2.7. Übertragung von lipophilen Begleitstoffen aus der ersten Waschflasche in die zweite	26
2.3. Überprüfung der Darmpräparation	26
3. Herstellung der radioaktiven Lösung für die Perfusion	26
4. Versuchstiere	27
5. Versuchsdurchführung	28
5.1. Operation	28
5.2. Perfusion	28
5.3. Blindversuche	30
5.4. Kontrollversuche	30
6. Analytik	31
6.1. Glucosebestimmung	31
6.2. Elektrolytbestimmung	31
6.3. Radioaktivitätsbestimmung	31
6.4. Untersuchung auf kovalente Bindung von Radioaktivität im Darmgewebe	31
6.5. Hochdruckflüssigkeitschromatographie	32
7. Berechnung der Ergebnisse	40
8. Ergebnisse	41
8.1. Vitalitätskriterien	41
8.1.1. Vitalitätskriterien bei nüchternen, gefütterten und mit Öl vorbehandelten Ratten	41
8.1.2. Vitalitätskriterien bei den einzelnen Ethanolkonzentrationen	43
8.2. Stoffwechsel von NDBA ohne Ethanolzusatz	45
8.3. Einfluß von verschiedenen Ethanolkonzentrationen auf den Stoffwechsel von NDBA	46
8.3.1. Verteilung der Gesamtradioaktivität	51
8.3.2. Verteilung der Gesamtmetaboliten	52
8.3.3. Veränderung des Metabolitenmusters	53

	Seite
IV. D I S K U S S I O N	62
1. Kritische Betrachtung der verwendeten Methode	62
2. Unterschiede im NDBA-Metabolitenmuster zwischen Jejunum- und Ileumsegmenten	64
3. Einfluß des Fütterungszustandes der Ratten auf die Vitalitätskriterien	66
4. Verstoffwechslung von NDBA in Abhängigkeit vom Fütterungszustand	66
5. Einfluß von Ethanol auf die Vitalitätskriterien	68
6. Einfluß von Ethanol auf den NDBA-Stoffwechsel	68
V. Z U S A M M E N F A S S U N G - S U M M A R Y	73
VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	77

ABKÜRZUNGEN

ADH:	Alkoholdehydrogenase
BBN:	N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamin
BCPN:	N-butyl-N-(3-carboxypropyl)nitrosamin
BHBN-3:	N-butyl-N-(3-hydroxybutyl)nitrosamin
HPLC:	Hochauflösendeflüssigkeitschromatographie
NDBA:	N-Nitroso-di-n-butylamin
NDEA:	N-Nitrosodiethylamin
NDMA:	N-Nitrosodimethylamin
R.A.:	Radioaktivität
S/M-Quotient:	Verhältnis der Konzentrationen einer Substanz zwischen Resorbat (S=Serosaseite) und Perfusat (M=Mukosaseite) nach Versuchsende

Anmerkungen

Alle Konzentrationsangaben von Ethanol oder Lösungsmitteln in Prozent beziehen sich auf Volumenprozent (v/v).

Bei den Tabellen ist aus drucktechnischen Gründen ¹⁴C-NDBA als ¹⁴C-NDBA geschrieben.

I. Problemstellung

Nitrosamine sind weit verbreitete sehr starke Umweltcancerogene. Sie konnten in Spuren in vielen Nahrungsmitteln nachgewiesen werden, wobei Dimethylnitrosamin, Nitrosopyrrolidin und Nitrosopiperidin am häufigsten gefunden wurden (1). Aber auch der Körper selbst ist befähigt, Nitrosamine aus Vorstufen im Magen-Darmtrakt zu bilden. Deshalb gehören die Nitrosamine gegenwärtig zu den intensivst bearbeiteten Stoffklassen auf dem Gebiet der chemischen Carcinogenese.

Bei peroraler Aufnahme von Fremdstoffen muß sich als erstes der Darm mit ihnen auseinandersetzen. Diesbezügliche Untersuchungen an Nitrosaminen ergaben, daß der Darm in der Lage ist, die Dialkylnitrosamine mit zunehmender Kettenlänge immer besser zu verstoffwechseln (2). Dibutylnitrosamin (NDBA), eines der wenigen Dialkylnitrosamine, das auch Harnblasenkrebs verursacht, wird somit vom Darm sehr gut metabolisiert.

Epidemiologische Studien zeigten, daß der Verbrauch von alkoholischen Getränken mit erhöhtem Krebsvorkommen in verschiedenen Organen, besonders im Ösophagus, verbunden ist (3,4). Es gibt jedoch keinen Beweis, daß Alkohol selbst eine carcinogene Potenz besitzt (5). Er kann jedoch co-carcinogen wirken (6). Untersuchungen über mögliche Wechselwirkungen zwischen Alkohol und Nitrosaminen sind daher von besonderer Aktualität.

In der vorliegenden Arbeit soll die akute Einwirkung von Alkohol, wie sie nach Konsum mäßiger Alkoholmengen, z.B. nach einem Glas Bier, vorliegt, auf den Transport und Metabolismus von Dibutylnitrosamin an nicht durchbluteten Darmsegmenten von Ratten untersucht werden. Dazu wurden Jejunum- und Ileumsegmente bei gleichbleibender Dibutylnitrosamindosierung steigenden Konzentrationen von Alkohol ausgesetzt.

II. Einleitung

1. Stoffwechsel von Ethanol

Ethanol hat im Gegensatz zu seinen Nachbarn in der Reihe der einwertigen Alkohole (Methanol, n-Propanol etc.), bei denen die Metaboliten stärker toxisch sind als die Substanz, selbst eine akut toxische, eventuell tödliche Wirkung (7). Nach Aufnahme wird Ethanol rasch und gleichmäßig im Körperwasser verteilt, sodaß nach 1-2 Stunden die maximale Konzentration im Blut und - wegen des schnellen Konzentrationsausgleichs - auch im ZNS erreicht ist. Die Eliminationsgeschwindigkeit ist im Gegensatz zu anderen körperfremden Stoffen nicht konzentrationsabhängig. Pro Stunde baut der Mensch rund 0,1 g/kg Körpergewicht ab.

Ethanol wird in geringen Mengen über Lunge und Nieren unverändert ausgeschieden, der Hauptanteil wird jedoch verstoffwechselt. Die cytosolische NADH - abhängige Alkoholdehydrogenase - sie besitzt als katalytisches Zentrum Zink - oxidiert Ethanol zu über 90% zu Acetaldehyd. Die Aldehyddehydrogenase bildet nun aus dem Acetaldehyd Essigsäure. Die Essigsäure wird nach Aktivierung mit Coenzym A im Intermediärstoffwechsel verbraucht und / oder im Tricarbonsäurezyklus zu Wasser und Kohlendioxid gespalten. Neben diesem Hauptweg werden 3-8% auch über Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenasen zu Essigsäure oxidiert. Geringe Ethanoldmengen werden auch nach direkter Glucuronidierung oder nach Koppelung an Schwefelsäure mit dem Harn ausgeschieden (Abb.1).

Der Alkoholabbau geschieht zum größten Teil in der Leber, aber auch in der Magen- und Darmschleimhaut befindet sich ein relativ hoher Gehalt an Alkohol- und Aldehyddehydrogenase (8).

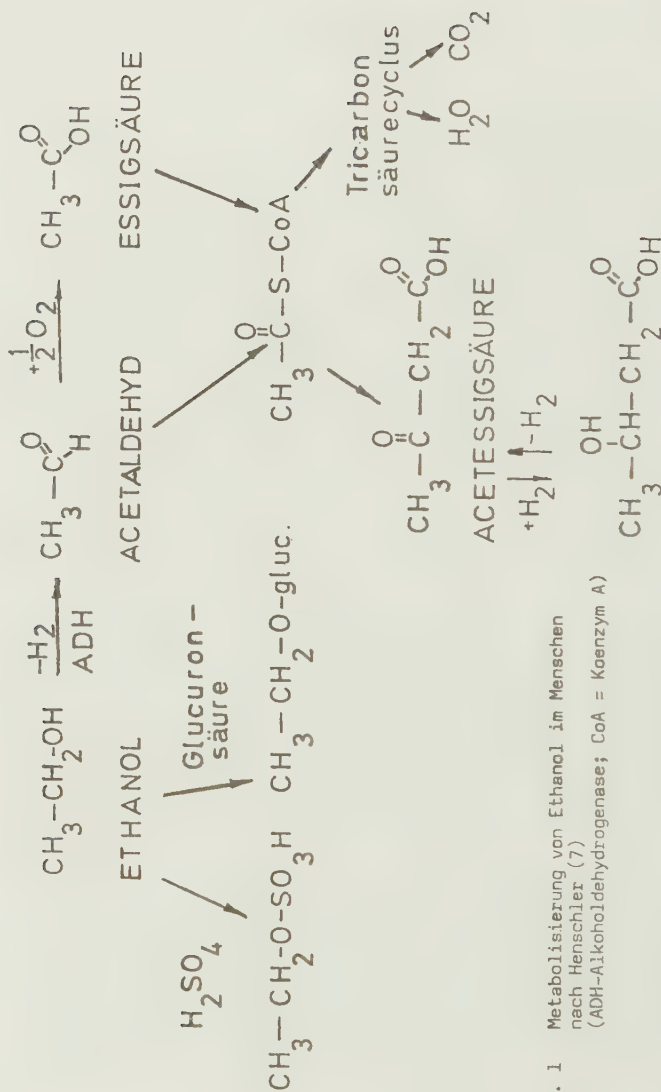


Abb. 1 Metabolisierung von Ethanol im Menschen
 nach Henschler (7)
 (ADH = Alkoholdehydrogenase; CoA = Koenzym A)

2. Wechselwirkungen von Ethanol mit anderen Stoffen

Der große Umsatz an alkoholischen Getränken bringt es mit sich, daß Alkohol beim Menschen häufig mit Fremdstoffen wie Arzneimitteln, aber auch in der Nahrung enthaltenen Schadstoffen, in Wechselwirkung treten kann.

Dabei muß man zwischen akuter und chronischer Alkoholaufnahme unterscheiden. Vor allem bei chronischer Alkoholzufuhr ist mit der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme zu rechnen: So konnte in den Lebermikrosomen mit Ethanol vorbehandelter Ratten ein erhöhter Gehalt an Cytochrom P-450 und an NADH-reduzierbarem Cytochrom b5 nachgewiesen werden (9). Ethanol induziert ein spezielles Isoenzym des Cytochrom P-450, welches sich von den Isoenzymen unterscheidet, die von den klassischen Induktoren Phenobarbital oder 3-Methylcholanthren induziert werden (10,11). Dies postulierten bereits Ullrich et al. (12), als sie Tetrahydrofuran als spezifischen Hemmstoff für die durch Ethanol induzierte Ethoxycumarindeethylase beschrieben. Aber auch im Darm findet man nach chronischen Ethanolgaben einen gesteigerten Gehalt an Cytochrom P-450 und eine erhöhte Aktivität der Benzpyrenhydroxylase (13).

Enzyminduktion kann zu beschleunigtem Abbau von Arzneimitteln und somit zu deren Wirkungsabschwächung führen. So sind bei Alkoholikern Barbiturate oft wirkungslos, während sich sonst Barbiturate und Alkohol bei gleichzeitiger Gabe in Bezug auf ihre Schlafwirkung verstärken (14).

Für das häufigere Auftreten der Wirkungsverstärkung durch Alkohol können im wesentlichen zwei Ursachen verantwortlich gemacht werden (7), Hemmung des Metabolismus des Arzneistoffes einerseits, Verstärkung der pharmakodynamischen Wirkung des Arzneistoffes am Wirkort andererseits. Durch Konkurrenz zwischen Alkohol und Pharmaka an den Monooxygenasen werden z.B. die Halbwertszeiten für Aminophenazon, Phenazon und Phenobarbital durch gleichzeitigen Alkoholgenuß verlängert. Die Wirkung auf Narkotika, Hypnotika, Analgetika und vor allem Psychophar-

maka wird andererseits durch gleichgerichteten Angriff am selben Rezeptor verstärkt.

Arzneistoffe und andere Fremdstoffe können ihrerseits den Ethanolstoffwechsel verändern. Langsamere Elimination einer oder beider Komponenten kann über Hemmstoffe der Alkoholdehydrogenase (wie Sulfonylharnstoffderivate, Metronidazol und resorbierbare Begleitstoffe von Tierkohle) bewirkt werden.

Neben der Wirkungsverstärkung durch Alkohol (quantitative Effekte) kann es bei Kombination mit bestimmten Stoffen auch zu Unverträglichkeitsreaktionen kommen. So führen Umgang mit Kalkstickstoffdünger und gleichzeitiger Alkoholgenuß zu charakteristischen - nur bei der Wirkstoffkombination beobachteten - Krankheitserscheinungen. Ähnliches wurde für Tetraethylthiuramdisulfid und beim Verzehr des Faltentintlings, eines Speisepilzes, bei gleichzeitigem Alkoholgenuß festgestellt.

3. Wirkungen von akuter Alkoholaufnahme am Darm

Akute Alkoholaufnahmen bewirken Veränderungen in der physiologischen Leistungsfähigkeit der Darmmucosa. So soll durch 1% Ethanol die $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ Aktivität in der Bürstensaummembran von Ratten und Meerschweinchen reduziert werden (15). Außerdem hemmt Ethanol den $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ -abhängigen stereospezifischen Bergauftransport von Aminosäuren im Dünndarm (16,17). Dieser hemmende Einfluß des Ethanols ist aber reversibel. Nach Entfernen des Alkohols aus dem Perfusionsmedium war die volle Transportfähigkeit wieder vorhanden.

4. Bedeutung des Darmes für die Biotransformation von Fremdstoffen

Die Leber hat unbestreitbar die höchste Kapazität Nahrungsmittel und in ihr enthaltene Fremdstoffe ("Xenobiotica") zu verstoffwechseln, und ist verantwortlich für die Umwandlung von Fremdstoffen, die in vivo in höheren Konzentrationen auftreten. Bei Xenobiotica jedoch, die in kleinen Mengen aufgenommen

werden, z.B. die Nitrosamine oder andere Cancerogene, wird auch dem Darm eine wichtige Rolle in der Biotransformation zugesprochen. So konnte gezeigt werden, daß die Dünndarmmucosa imstande ist, oral verabreichte Stoffe in einem hohen Grade während der Resorption zu metabolisieren (18). Gibbaldi und Perrier haben diese Verstoffwechslung beim ersten Durchtritt in Anlehnung an den bei der Leber geprägten Begriff des "first-pass"-Effekts als "intestinalen first-pass"-Effekt bezeichnet (19). Um Verwechslungen vorzubeugen, findet man heute häufig stattdessen den Begriff "präsystemischer Metabolismus" (20). Xenobiotica nützen nur selten einen spezifischen Absorptionsmechanismus - wie viele physiologisch wichtige Stoffe -, sondern penetrieren, da sie meist lipophil sind, leicht passiv durch biologische Membranen und gelangen so in die Epithelzellen der Darmschleimhaut. Dort kommen sie sowohl mit dem Phagozytose- und Immunsystem als auch mit dem Biotransformationssystem der Darmschleimhaut zusammen, durch welche sie abgebaut werden. So stellte Wattenberg fest, daß der Dünndarm außer der Eintrittspforte auch eine erste Abwehr gegen toxische Stoffe darstellt (21). Es wurde postuliert, daß unter normalen Bedingungen Giftstoffe, die mit der Nahrung in geringsten Konzentrationen aufgenommen werden, wahrscheinlich nicht oder nur sehr wenig in den portalen Kreislauf gelangen (18). In jüngerer Zeit konnte gezeigt werden, daß der Darm als Stoffwechselorgan nicht nur dann eine Rolle spielt, wenn er mit dem Fremdstoff während der Resorption in Kontakt kommt, sondern er kann auch von der Blutseite ankommende Fremdstoffe metabolisieren (22).

Die Biotransformation ist der einzige quantitativ bedeutsame Weg, auf dem der Körper lipophile Xenobiotica ausscheiden kann (23), sieht man einmal von Sonderfällen der Ausscheidung über die Milch bei Säugetieren oder Eier bei Geflügel ab. Durch die Biotransformation werden die Fremdstoffe zu wasserlöslicheren Stoffen umgewandelt und über Niere und Galle ausgeschieden. Man unterscheidet im wesentlichen zwei Phasen, die von vielen Fremdstoffen im Rahmen ihres Abbaues durchlaufen werden und

als Phase-I- und Phase-II- Reaktionen bezeichnet werden. Die erste Phase besteht aus Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse. Sie wird über die mischfunktionellen Oxydasen, die am glatten endoplasmatischen Retikulum gebunden sind, katalysiert. Diese Enzyme heißen auch Monooxygenasen, da sie nur ein Sauerstoffatom übertragen, und benötigen für die Oxidation in der Regel ein Hämprotein, das Cytochrom P-450, ein Flavinenzym und die NADPH- Cytochrom-c Reductase. Das Cytochrom P-450 besteht aus zahlreichen Isoenzymen. Während aus der Leber schon über 20 Formen von Cytochrom P-450 isoliert wurden, konnten im Darm beim Kaninchen im wesentlichen 4 verschiedene Formen gefunden werden (24). Der Gehalt an Cytochrom P-450 ist im Duodenum und Jejunum am höchsten; im Ileum ist nur eine relativ geringe Aktivität vorhanden. Die vom Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenaseaktivität ist in den Zottenspitzen am höchsten und in den Krypten am niedrigsten (25). Im Vergleich zur Leber besitzt der Darm jedoch eine wesentlich geringere Monooxygenaseaktivität. Sie kann aber auch am Darm durch bestimmte Stoffe, z.B. Phenobarbital, 3-Methylcholanthren (26), aber auch chronische Ethanolgaben gesteigert werden.

Bei der zweiten Phase der Biotransformation werden die hydroxylierten Produkte durch Glucuronidierung, Sulfatierung und Bindung an Glutathion noch wasserlöslicher. Diese Phase-II- Reaktionen spielen im Darm eine wesentlich größere Rolle als Phase-I- Reaktionen. So konnte für Isoprenalin bei Hunden, Salicylamid beim Menschen und Morphin bei Ratten ein intestinaler first-pass-Effekt durch Konjugationsreaktionen festgestellt werden (25).

Besonders die Glucuronidierung spielt im Darm eine wichtige Rolle (18). Sie ist hier auch relativ resistent gegenüber Stoffen, die die Glucuronidierung in der Leber hemmen. Beispielsweise hemmten niedrige Ethanolkonzentrationen (10 mmol) die Glucuronidierung von 2-Naphthol und Phenolphthalein in isolierten Hepatozyten (27), während in den Darmmikrosomen die Glucuronidierung von 1-Naphthol durch Ethanol nicht beeinflusst wurde (28).

Phase-II- Reaktionen sind auch wichtig im Zusammenhang mit der Entgiftung von toxischen Zwischenprodukten (z.B. von Epoxiden), die durch die Monooxygenasen entstehen können. Diese instabilen Zwischenprodukte sind häufig hoch reaktiv und können u.a. mit der DNA reagieren und somit die genetische Information verändern. Mikrosomale Enzyme wie Glucuronyltransferase, Epoxid-Hydratase und Glutathion-S-Transferase können die Reaktion verhindern, indem sie sich selbst mit den Stoffwechselzwischenprodukten verbinden.

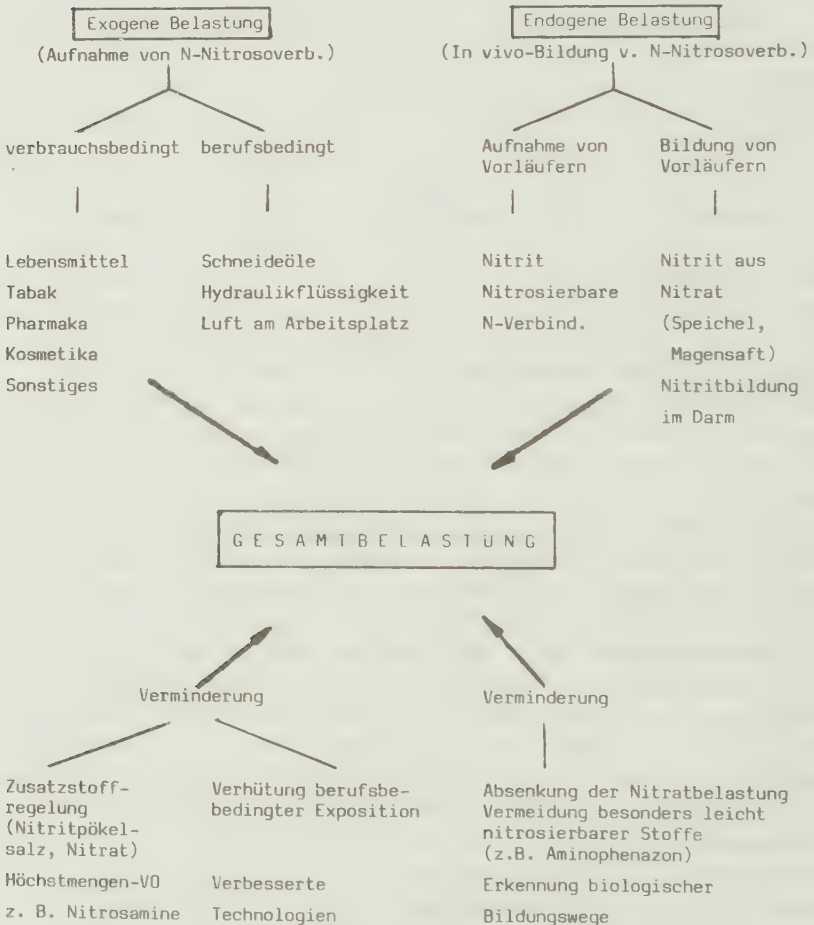
5. Vorkommen und toxikologische Bedeutung von Nitrosaminen

Die N-Nitrosoverbindungen, zu denen neben den Nitrosaminen auch die Nitrosamide gerechnet werden, gehören zu den potentesten und vielseitigsten Cancerogenen, die heute bekannt sind. Über 80% der bisher untersuchten Stoffe dieser Klasse sind cancerogen, wobei keine Tierart festgestellt werden konnte, die resistent ist (29). Deshalb muß man, auch wenn der Beweis dafür noch nicht erbracht ist, eine cancerogene Wirkung beim Menschen vermuten. Nitrosoverbindungen verursachen ein breites Spektrum von Tumoren; durch Wahl der geeigneten Verbindung ist es möglich, selektiv - also an bestimmten Organen - Tumore zu erzeugen. Oft genügt schon eine einmalige Dosis zur Induktion eines bösartigen Tumors.

Nitrosoverbindungen sind weit verbreitet; so finden sie sich in Lebensmitteln, wie Rauchbier, rohem Schinken, Hartkäse, in Tabak, Kosmetika, Arzneimitteln und Pestiziden (1,30). Außerdem gibt es berufsbedingte Expositionen. Das hier untersuchte NDBA konnte in Spuren in der Innenraumatmosphäre neuhergestellter Kraftfahrzeuge (29), in Gummifabriken und in Produkten der Gummiindustrie (31,32,33), z.B. in Säuglingsschnullern ("baby rubber nipple"), nachgewiesen werden.

Neben diesen exogenen Belastungen gibt es jedoch eine nicht zu vernachlässigende endogene Exposition (Abb.2). Nitrosamine können aus nitrosierbaren Aminoverbindungen und Nitrosierungsmitteln in wäßriger Lösung besonders bei saurem pH entstehen. Vor

Abb. 2: Belastung durch carcinogene N-Nitrosoverbindungen nach Eisenbrand (30)



allem im Magen sind daher Nitrosierungsreaktionen möglich, wobei Chlorid die Reaktionsgeschwindigkeit und Ausbeute erhöht. Ascorbinsäure, in geringem Maße auch Harnstoff, hemmen die Nitrosierung.

Ein Nitrosierungsmittel ist Nitrit, das aus Nitrat durch Bakterien leicht gebildet werden kann. Nitrit ist in gepökelten Fleisch- und Wurstwaren und in Fischprodukten enthalten, denen Nitrit zur Umrötung, Geschmacksbildung und als Konservierung zugesetzt wird. Auch als Bestandteil des normalen Speichels wurde Nitrit nachgewiesen. Nitrat wird hauptsächlich über Trinkwasser und Gemüse, z.B. Blattsalat und Spinat, aufgenommen. Die nitrosierbaren Aminoverbindungen sind ebenso weit verbreitet (Wein, Bier, Fleisch).

Daher ist es wichtig, durch gesetzliche Bestimmungen den Gehalt an Nitrit und Nitrat möglichst gering zu halten.

6. Wirkung und Stoffwechsel von Dibutylinitrosamin (NDBA)

Das hier untersuchte NDBA bewirkt neben Leber- und Ösophaguskrebs - als eine der wenigen N-Nitrosoverbindungen - noch Blasenkrebs. Welche Krebsart gebildet wird, ist von der Dosis, Applikationsart und Tierspezies abhängig. Hohe Dosen bewirken - oral gegeben - besonders Leberkrebs, während bei niedrigen Konzentrationen und bei subcutaner Verabreichung hauptsächlich Harnblasenkrebs entsteht (34). Die unterschiedliche Disposition verschiedener Tierspezies für den Blasenkrebs liegt an der unterschiedlichen Verstoffwechselung des NDBA (35).

Der Abbau des NDBA kann über vier Hydroxylierungswege ablaufen (36,37,38):

omega, omega-1, omega-2, omega-3, und alpha-Hydroxylierung

Die Abb.3 zeigt die möglichen Reaktionswege.

Nur durch die ω -Oxidation kommt es zu den Metaboliten, die für den Harnblasenkrebs verantwortlich gemacht werden. Dieser Reaktionsweg ist in vivo etwa gleichbedeutend mit der ω -1-Oxidation, während in der Leber in vitro die ω -1-Oxidation bei

weitem überwiegt. Im Gegensatz dazu ist am Darm in vivo wie in vitro die ω -Oxidation am bedeutsamsten. Durch Oxidation des letzten Kohlenstoffatoms einer der beiden Alkylketten entsteht über BBN (N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamin), welches selektiv Harnblasenkrebs verursacht, BCPN (N-butyl-N-(3-carboxypropyl)nitrosamin), der letztendlich für den Blasenkrebs verantwortliche Metabolit. Durch β -Oxidation entstehen nach dem von Knoop beschriebenen Stoffwechselweg aus dieser Säure weitere Abbauprodukte, vor allem BCMN (N-butyl-N-carboxymethyl)nitrosamin) (37).

Der zweite Weg ist die ω -1-Oxidation, dessen erster Metabolit nicht cancerogen ist, bei dessen weiterem Abbau es aber, wie bei der selteneren ω -2-Oxidation, zu schwach cancerogenen Stoffen kommt.

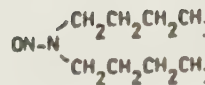
Die α -Hydroxylierung - bei ihr wird ein Sauerstoffatom am ersten Kohlenstoffatom der Alkylkette eingebaut - kommt bei allen Dialkylnitrosaminen vor und wird für die mutagene Aktivität der Nitrosamine verantwortlich gemacht (39). Das erste sehr instabile Hydroxylierungsprodukt zerfällt spontan in ein Aldehyd und ein Alkyldiazohydroxyd, das weiter in ein Alkylcarbeniumion übergeht. Dieses bildet mit Wasser einen Alkohol, es kann aber Alkylierungsprodukte mit anderen Zellbestandteilen, z.B. der DNA, bilden. Im Falle des NDBA entstehen somit nach α -Hydroxylierung Butyraldehyd und Butanol als Stoffwechselprodukte.

Nachdem die Nitrosamine erst über α -Hydroxylierung zu proximalen Carcinogenen aktiviert werden, nennt man sie Präcancerogene, also Stoffe mit systemischer Wirkung (30).

Betrachtet man die verschiedenen möglichen Abbauewege des NDBA, so können also Giftungen, Entgiftungen und die Aktivierung zum proximalen Carcinogen erfolgen. Vom Darm wird die Verbindung, wenn sie in niedriger Dosierung gegeben wird, zum größten Teil während der Resorption verstoffwechselt (40); dabei wird sie offensichtlich in erster Linie gegiftet, denn es entsteht BCPN als Hauptmetabolit (2). Daneben finden sich aber auch Produkte

der ω -1-Hydroxylierung und - als Ausdruck der Aktivierung (α -Oxidation) - eine kovalente Bindung an Proteine des Darms und CO_2 als Folge des weiteren Abbaus von Butyraldehyd bzw. Butanol.

Im Zusammenhang mit den vorliegenden Untersuchungen war daher besonders die Frage zu klären, ob Ethylalkohol den Stoffwechsel am Darm überhaupt beeinflußt, und ob eine mögliche Veränderung - mehr im Sinne einer gesteigerten oder reduzierten Giftung bzw. Entgiftung - abläuft.

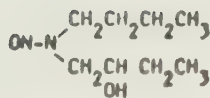
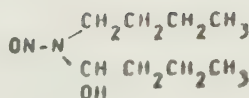


NOBA

märe Oxidationen am

α

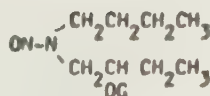
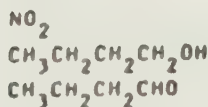
(ω -2



BHBN-2



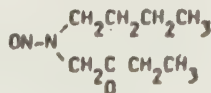
BH



BHBN-2-G



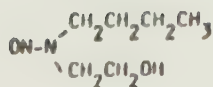
BHBN



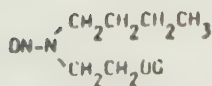
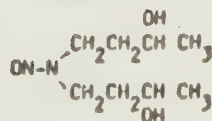
BOBN-2



BOB



BHBN



BHBN-G



Abb. 3 Verstoffwechselung in der Ratte nach

III. Eigene Untersuchungen

1. Material

1.1. Reagenzien

(Sämtliche Reagenzien sind, wenn nicht anders angegeben, von p.a. Qualität und stammen von der Fa. Merck Darmstadt)

1.1.1. Perfusion

- a. NDBA: 1-¹⁴C-N-Nitroso-di-n-butylamin,
spezifische Aktivität:
7,08 mCi/mmol (262×10^6 Bq/mmol)
30,00 mCi/mmol (1110×10^6 Bq/mmol)
Reinheit > 99%; (Dr. Wiessler, Deutsches Krebs-
forschungszentrum, Heidelberg)
NDBA "kalt" ISOPAC N 5132 (Molekulargewicht: 158,2)
Sigma Chemie GmbH, München
- b. Ethanol
- c. Ether tech.
- d. physiologische Kochsalzlösung (9 g NaCl/Liter)
- e. Tyrodelösung: 140 mmol/l NaCl
3 mmol/l KCl
12 mmol/l NaHCO₃
0,3 mmol/l Na₂HPO₄
14 mmol/l Glucose
1,4 mmol/l CaCl₂ * 2 H₂O
0,5 mmol/l MgCl₂ * 6 H₂O
auf 1 Liter Aqua dest.
- f. n-Butanol
- g. Methoxyethylamin tech.
BASF, Ludwigshafen
- h. n-Pentanol

- i. Methanol p.a. und tech.
- j. Aqua dest.
- h. Aceton tech.

1.1.2. Bestimmung der Vitalitätskriterien

- a. Elektrolytbestimmung: Lithium (5 mmol/l) Stammlösung
für flammenphotometrische
Serumanalysen
Serum-Standard-Stammlösung für
flammenphotometrische Analysen

Eppendorf, Hamburg

- b. Glucosebestimmung: 0,33 mol Perchlorsäure
GOD-perid^R Methode
Boehringer, Mannheim

1.1.3. Analytik

- a. HPLC

-Acetonitril

-Ethanol

-Methanol

-2-Propanol

-Puffer 1: pH 2 A: 0,1 mol/l Citronensäuremono-
hydrat

B: 0,2 mol/l Di-Natriumhydrogen-
phosphat

für 1 Liter: 988 ml Lösung A und 12 ml Lösung B

-Puffer 2: pH 6,8 7 mol/l Ammoniumcarbaminat

15 mol/l Kaliumdihydrogen-
phosphat

für 1 Liter Aqua tridest.

- b. Radioaktivitätsmessung

-Omni-Szintisol^R

- c. Kovalente Bindung

-Ethanol tech.

-Ether tech.

-Protosol^R, Gewebelöser
NEN, Boston

1.2. Geräte

1.2.1. Perfusion

- a. Glasperfusator modifiziert nach Fisher und
Parsons
Fa. Kugelstatter, Garching
- b. Waschflaschen
Fa. Kugelstatter, Garching
- c. Thermostat, D 3
Haake, Karlsruhe
- d. Waage Mettler PC 440 Delta Range
Gießen
- e. Sep Pak : Silica Cartridge for Rapid Sample
Preparation
Waters Associations Inc., Königsstein

1.2.2. Bestimmung der Vitalitätskriterien

- a. Polypropylenreaktionsgefäße 1,5 ml
Eppendorf, Hamburg
- b. Polypropylenzentrifugenröhrchen 5 ml
Sarstett, Nümbrecht
- c. Flammenphotometer FCM 6341
Eppendorf, Hamburg
- d. Mixer 5432
Eppendorf, Hamburg
- e. Zentrifuge 5412
Eppendorf, Hamburg
- f. Photometer 1101 M mit Absaugpumpe 4151
Eppendorf, Hamburg

1.2.3. Analytik

- a. HPLC
 - Ampullen N 11-1
Macherey-Nagel, Düren
 - Bördelkappen N 11 IB/oa
Macherey-Nagel, Düren
 - HPLC-Autosampler sph 125
Gynkotek, München
 - Column Switching Module
Gynkotek, München

- Gradient Former Model 250 B
Gynkotec, München
- HPLC-Pumpe: High Precisions Pump, Model 300 B
Gynkotec, München
- HPLC-Pumpe: Constant Flow Pump, Model 600/200
Gynkotec, München
- Fraktionssammler, Frac-100
Pharmacia, Uppsala
- Radioaktivitäts-HPLC-Detektor, IM 2000
mit Apple II europlus und Matrixdrucker Epson 82 F/T
Isomess, Straubenhardt
- HPLC-Trennsäule: 4,6 mm x 250 mm gefüllt mit ODS;
5 µm als Sorbens
Bischoff Analystechnik, München
- HPLC-Vorsäulenkartuschen: 100 mm und 200 mm, gefüllt
mit Nucleosil^R: C18, 30 µm als Sorbens
Bischoff Analystechnik
- Integrator, 3390 A
Hewlett Packard, Frankfurt

b. Radioaktivitätsmessung

- Kunststoffzählfläschchen: Polyvials 714, 22 ml
Zinsser, Frankfurt
Minivials 88, 5,5 ml
Zinsser, Frankfurt
- Liquid szintillation counter:
LKB 1215 Rack Beta II Wallac
LKB, München

c. Kovalente Bindung

- Ganzglas-Homogenisator nach Potter-Elvehjem, 5ml
Schütt, München
- Schüttelgerät
Heidolph, Kehlheim
- Zentrifuge: Minifuge GL
Heraeus-Christ GmbH, Osterrode

d. Auswertungsprogramm

- Multiplan für Apple II europlus
Microsoft GmbH, Taufkirchen

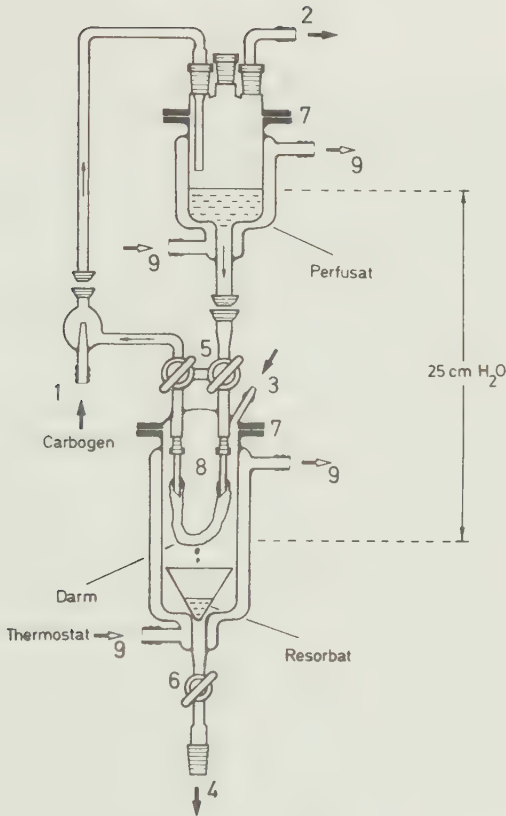


Abb. 4: Glasperfusator modifiziert nach Richter und Strugala (41)

- 1: Zufuhr von Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) über Glasolive
- 2,3: Überleitung des Carbogens von der oberen Perfusionskammer (2) über einen Teflonschlauch (nicht eingezeichnet) in die untere Kammer (3)
- 4: Ableitung des Carbogens aus der unteren Perfusionskammer in die Waschflaschen (nicht eingezeichnet)
- 5: Dreiwegehähne aus Teflon
- 6: Zweiwegehahn aus Teflon
- 7: Planschliffverbindung zum Verschluss der Kammern
- 8: Glaskanülen
- 9: Die nicht ausgefüllten Pfeile kennzeichnen den Weg des thermostatisierten Wassers. Die Schlauchverbindungen sind nicht eingezeichnet.

2. Methodik

2.1. Beschreibung der Versuchsanordnung

Für die in vitro - Untersuchung des Nitrosaminstoffwechsels am Darm wurde der Ganzglasperfusator nach Richter und Strugala verwendet (41), der auf der erstmals von Fisher und Parsons 1949 beschriebenen (42) und von Rummel und Stupp (43) modifizierten Methode beruht (Abb.4). Der Ganzglasperfusator hat sich für die Untersuchung des Stoffwechsels von lipophilen, wasserdampfvlüchtigen Fremdstoffen, z.B. den Nitrosaminen, zur Vermeidung von undefinierbaren Verlusten bewährt.

Er besteht hauptsächlich aus drei Teilen: einer oberen und unteren Kammer und einem Verbindungsstück.

Beide Kammern bestehen aus doppelwandigem Glas und können von einem Wasserbad auf 38 °C thermostatisiert werden. Die obere Kammer hat ein Fassungsvermögen von 100 ml und wird durch einen gewölbten Deckel mittels Planschliff und Ringklammer verschlossen. Im Deckel befinden sich drei Öffnungen zur Aufnahme von NS-14 Schliffkonen. Das Abflußrohr der oberen Kammer wird durch Kugelschliff und Klammer am Verbindungsstück befestigt.

Die untere Kammer hat ein Fassungsvermögen von 250 ml; ihr Abflußrohr besitzt einen Zweiwegehahn und einen NS-14 Konus, an den die Waschflaschen mittels Klammer befestigt werden. Die Oberseite der unteren Kammer besitzt einen Planschliff. In ihrem Innern enthält sie ein Spitzglas, das die vom Darm resorbierte Flüssigkeit auffängt, und ein Filterpapier, das vor Versuchsbeginn befeuchtet wird.

Das Verbindungsstück besteht aus zwei Dreiwegehähnen, einer Glasolive zur Einleitung von Gas, einem Glasrohr zur Überleitung des Gases in die obere Kammer, zwei Kugelschliffen, die der Befestigung an der oberen Kammer dienen, und aus einem hohlen Deckel mit Planschliff, an dem die untere Kammer mittels Ringklammer angebracht wird. Zwischen den beiden Planschliffen des Verbindungsstücks und der unteren Kammer wird ein Gummiring zur besseren Abdichtung eingelegt. Der Deckel besitzt eine in Form einer kleinen Glasolive gebildete Öffnung nach

außen und zwei von den Dreiwegehähnen kommenden Glasröhrchen mit NS-7 Schliffen, welche die in Glaskanülen eingebundenen Darmstücke aufnehmen. Die Glaskanülen haben auf der einen Seite einen NS-7 Konus, auf der anderen Seite eine Einkerbung, in welche die zu untersuchenden Darmsegmente eingebunden werden. Der Glasperfusator wird durch Carbogen(95% O_2 , 5% CO_2), das ihm aus einer Gasflasche über die Glasolive des Verbindungsstücks zugeführt wird, begast. Die Gaszufuhr kann, außer an dem Haupthahn der Gasflasche, individuell für jeden Perfusator an einer Schraube eingestellt werden.

Die Dreiwegehähne werden auf Rezikulieren gestellt und die Gaszufuhr geöffnet. Jetzt kann die Perfusionslösung (50 ml) in die obere Kammer gefüllt werden. Sie steigt in dem Verbindungsrohr zwischen Glasolive und oberer Kammer hoch, und wird vom zugeführten Gas mitgerissen und in die obere Kammer zurückgeführt. Dadurch kommt ein Perfusionsfluß von ca. 55-65 ml/min zustande.

Das Carbogen verläßt die obere Kammer durch den rechten Schliff und wird von da aus durch einen Teflonschlauch (7 mm Außen-, 5 mm Innendurchmesser, ca. 40 cm lang) in die untere Kammer geleitet. Der Teflonschlauch wird auf die kleine olivenförmige Öffnung im Deckel der unteren Kammer aufgesteckt.

Das Carbogengemisch verläßt die untere Kammer durch das Abflußrohr und wird durch eine Reihe von Waschflaschen gereinigt. In einer früheren Arbeit von Richter-Cooberg (40) wurden drei Waschflaschen verwendet. In der ersten befanden sich 15 ml n-Butanol zur Extraktion von lipophilen Substanzen, in der zweiten 15 ml Methoxyethylamin, um das vom Darm gebildete Kohlendioxid zu binden, und in der dritten Waschflasche waren 15 ml Wasser enthalten, um das während der zweistündigen Perfusionsdauer aus der zweiten Waschflasche austretende stark riechende, giftige Methoxyethylamin zu absorbieren.

Eine Gruppe von fünf Perfusatoren ist in einem Abzug angeordnet. In ihm befindet sich ein Heizgebläse, das die Luft auf ca. 40 °C erwärmt. Dies ist nötig um Kondenswasserbildung am

Deckel der unteren Kammer zu vermeiden. Die obere und untere Kammer werden durch einen Wasserbadthermostat auf 38 °C erwärmt.

2.2. Untersuchungen über mögliche Verbesserungen der Methodik

Für die Untersuchung von Nitrosaminen, in diesem Fall des N-Dibutylnitrosamins, zeigt die oben dargestellte Perfusionsanordnung mit drei Waschflaschen im wesentlichen drei Schwachstellen:

Kontamination des Darmes von außen, gasdichter Verschuß der unteren Kammer mit dem Mittelstück und Übertragung von in der ersten Waschflasche gelösten Substanzen in die zweite Kohlendioxid absorbierende Waschflasche.

Außerdem wurde noch getestet, ob Butanol, ein möglicher Metabolit von NDPA, der nach α -Hydroxylierung (39) entsteht, durch ein anderes Lösungsmittel in der Waschflasche ersetzt werden sollte.

2.2.1. Kontamination des Darmes von außen

Das Nitrosamin hat einen niedrigen Siedepunkt (116 °C) und ist sehr wasserdampfgefährlich. Bei Leerperfusionen (ohne Darm) fanden sich im Mittel 33% der eingesetzten Radioaktivität in der ersten Waschflasche wieder, während sich im Perfusat nur noch 61% der Radioaktivität befanden. Das flüchtige Nitrosamin strömt zusammen mit Carbogen und Wasserdampf durch den Teflonschlauch in die untere Kammer und kann so den Darm von außen und das Resorbat kontaminieren.

2.2.2. Problem des gasdichten Verschlusses der unteren Kammer

Der Zusatz von Nitrosamin in die obere Kammer erfolgte zwar erst, wenn beide Kammern dicht verschlossen waren und das Gasgemisch, das immer den Weg des geringsten Widerstandes geht, durch die Waschflasche entweichen mußte. Dies zeigte sich durch das schnelle Perlen des Waschflascheninhaltes an. Daraus konnte jedoch nicht mit Sicherheit geschlossen werden, daß die

Kammern absolut gasdicht waren. Dies bestätigten die starken Schwankungen in den Wiederauffindungsraten (zwischen 80% und 95%).

Daher wurden Versuche unternommen, die Kontamination des Darmes von außen dadurch zu vermeiden, daß man die Kammern nicht mehr direkt mit dem Teflonschlauch verbindet.

Um die Lebensfähigkeit des Darmes zu gewährleisten, müssen dabei jedoch Sauerstoff- und Feuchtigkeitzufuhr zur unteren Kammer erhalten bleiben.

2.2.3. Einführung der separaten Belüftung für die untere Kammer

Der Teflonschlauch, der die obere mit der unteren Kammer verbindet, wurde entfernt. In der oberen Kammer wurden am rechten Schliffkonus drei Waschflaschen (1. Pentanol oder Methanol/Wasser- Gemisch 1:1 (v/v); 2. Methoxyethylamin; 3. Wasser) in Serie geschaltet. Das über die Glasolive zugeführte Carbogen diente nur mehr dazu, die Perfusionslösung mit Sauerstoff zu sättigen und in Fluß zu halten. Es verläßt die obere Kammer sofort wieder durch die drei Waschflaschen, wobei die lipophilen wasserdampfvlüchtigen Stoffe in der ersten und das gebildete Kohlendioxid in der zweiten Waschflasche gebunden wurden.

Die untere Kammer mußte eine eigene Carbogenzufuhr erhalten, um zu verhindern, daß der Darm austrocknet und seine gute Resorptionsleistung verliert. Da das befeuchtete Filterpapier in der unteren Kammer nicht als Feuchtigkeitsspender ausreicht, wurde das Carbogen vorher mit Wasserdampf gesättigt. Man leitete das Gas von unten nach oben durch ein mit Wasser gefülltes doppelwandiges, auf 38 °C thermostatisiertes Glasgefäß mit Glasfritte am unteren Boden. Dies diente dazu, das Gas zu erwärmen und mit Wasserdampf zu sättigen. In dem Deckel des Glasgefäßes befanden sich fünf olivenförmige Öffnungen, auf denen je ein Gummischlauch befestigt war, durch die das Gas dann zu den jeweils fünf Perfusatoren im Abzug geleitet wurde. Das Gas wurde durch die Öffnung im Deckel des Verbindungsstücks in die untere Kammer eingeleitet und verließ sie durch die drei untere-

ren Waschflaschen mit Pentanol oder Methanol/Wassergemisch, Methoxyethylamin und Wasser. Somit waren die untere und die obere Kammer, was die Gaszufuhr betraf, zwei völlig getrennte Systeme, und der Darm konnte nicht mehr von außen kontaminiert werden. In der ersten oberen und in der ersten unteren Waschflasche befanden sich am Ende der zweistündigen Perfusion zusammen durchschnittlich 19,5% der gesamten eingesetzten Radioaktivität. Das meiste davon war in der oberen Waschflasche absorbiert (19,34%). Die Wiederauffindungsraten waren deutlich höher; sie lagen durchschnittlich bei 95% (n=24).

Dieses arbeitsaufwendige (sechs Waschflaschen/Perfusator), aber theoretisch gute System zeigte jedoch einen sehr wesentlichen Fehler. Durch die separate Belüftung kann es leicht zu einem Druckunterschied zwischen der Innen- und Außenseite des Darmes kommen. Häufig war der Druck im Darmlumen höher, was über eine Blähung nach ca. einstündiger Perfusion zu einer Ruptur führte. Der Druckunterschied war in erster Linie von dem von den oberen Waschflaschen ausgehenden Widerstand abhängig. Dieser war jedoch von Perfusion zu Perfusion unterschiedlich und nahm in der Regel mit zunehmender Anzahl durchgeführter Perfusionen zu, wahrscheinlich als Folge von zunehmenden Verunreinigungen der Glasfritte der Waschflaschen, die durch noch so gründliches Spülen mit Lösungsmitteln nicht verhindert werden konnte. Es wurde daher von der separaten Belüftung wieder abgegangen.

2.2.4. Versuch mit einer oberen Waschflasche

An die obere Kammer wurde nur eine Waschflasche mit Wasser angeschlossen und über einen Gummischlauch mit der unteren Kammer verbunden. Dabei wurde von der Überlegung ausgegangen, daß es bei einer Waschflasche nicht zu großen Druckunterschieden kommen sollte. Bei einer Leerperfusion wurden aber nur 67% der Radioaktivität wiedergefunden, und zwar 44% im Perfusat, nur 17% in der oberen und 6% in der unteren Waschflasche. Man mußte deshalb davon ausgehen, daß sehr viel Radioaktivität im Gummischlauch verschwunden war. Man hätte zwar den Gummi-

schlauch durch Teflon ersetzen können, aber das Problem der Übertragung von Radioaktivität von der oberen in die untere Kammer wäre damit nicht gelöst gewesen.

2.2.5. Einführung von Sep Pak

An die Stelle, an der der Teflonschlauch mit der unteren Kammer verbunden ist, wurde ein Sep Pak eingeführt. Dieses ist ein kleines mit C18-Material gefülltes Säulchen, das ansonsten für die Probenvorbereitung in der HPLC benutzt wird. Es sollte die im Gasstrom enthaltenen lipophilen radioaktiven Substanzen binden. Bei der Durchführung einer Leerperfusion mit radioaktiv markiertem Nitrosamin wurden nach zweistündiger Perfusion im Sep Pak (es wurde mit je 1 ml Isopropanol viermal durchgespült und die Radioaktivität gemessen) 28% der eingesetzten Radioaktivität bei einer Wiederfindungsrate von 100% ermittelt. In den zwei, an die unteren Kammern angeschlossenen Waschflaschen (1. Butanol, 2. Wasser), befanden sich im Butanol 0,21% und im Wasser 0,01% der Radioaktivität. Dieses Verfahren wäre befriedigend, wenn sich nicht durch Behinderung des Luftstroms durch das Sep Pak wieder ein Druckunterschied zwischen beiden Kammern aufbauen würde und es somit zu ähnlichen Problemen käme wie bei der separaten Belüftung. Es wurde daher wieder zu der ursprünglichen Versuchsanordnung zurückgegangen.

2.2.6. Versuche mit anderen Lösungsmitteln anstelle von Butanol

Bei den Vorversuchen wurden für die erste Waschflasche teilweise Pentanol oder Methanol-Wassergemisch und nicht Butanol verwendet. Es sollte geprüft werden, ob Butanol oder Butyraldehyd in der ersten Waschflasche nachgewiesen werden kann (39). Da es jedoch weder mit Hilfe des Gaschromatographen noch der HPLC gefunden werden konnte, wurde wieder Butanol als Waschflascheninhalt verwendet und die dort gefundene Radioaktivität dem nicht verstoffwechselten NDBA zugerechnet.

2.2.7. Übertragung von lipophilen Begleitstoffen aus der ersten Waschflasche in die zweite

Es wurde festgestellt, daß die erste Waschflasche nicht die gesamten lipophilen Begleitstoffe absorbieren kann. Ca. 1 Prozent wurde in die zweite Waschflasche übertragen. Damit sich bei der Berechnung des durch α -Hydroxylierung gebildeten Kohlendioxid kein Fehler einschlich, wurde für die Versuche eine weitere Waschflasche mit Butanol vor die Waschflasche mit Methoxyethylamin geschaltet.

2.3. Überprüfung der Darmpräparation

Nachdem die Versuche zur Verbesserung der Methodik die Dichtigkeit der Darmpräparation als wichtigste Fehlerquelle hatten, wurde vor Beginn der ersten Hauptversuche überprüft, ob die Därme in den Perfusatoren über die Zeit von zwei Stunden auch dicht bleiben. Dazu wurde in das Perfusionsmedium ^{14}C -Inulin gegeben, das vom Darm nicht resorbiert wird und sich bei dichter Darmwand daher nicht im Resorbat auffinden dürfte. Im Resorbat von Jejunum befanden sich nach zwei Stunden 0,06% der gesamten Radioaktivität, im Resorbat vom Ileum 0,85%.

3. Herstellung der radioaktiven Lösung für die Perfusion

Um mit dem Radioaktivitätsdetektor die Proben von Resorbat und Perfusat gut und mit deutlichen Peaks analysieren zu können, ist eine Radioaktivität von 35000-40000 dpm/ml (= 583,3 - 666,7 Bq/ml) Perfusat nötig. Für die Untersuchungen wurden zwei verschiedene Lieferungen von ^{14}C -NDBA verwendet.

^{14}C -NDBA-Lösung I:

Für die Kontrolle, die Leerperfusion und die Versuche mit 0,5%-igem und 2%-igem Ethanol wurde ^{14}C -NDBA (Reinheit >99%) mit der spezifischen Aktivität von 30 mCi/mmol (1110×10^6 Bq/mmol) mit 2,165 mg kaltem NDBA verdünnt. Die so hergestellte Stammlösung hatte eine spezifische Aktivität von

7,22 mCi/mmol ($267,1 \times 10^6$ Bq/mmol). Pro Apparatur wurden 50 μ l dieser Stammlösung ($=2,05$ nmol ^{14}C -NDBA/ml Perfusionsmedium) eingesetzt.

Bei den ersten sechs Versuchen wurde eine Standardlösung hergestellt. In 50 ml Tyrodelösung wurden 50 μ l der ^{14}C -NDBA-Stammlösung gegeben. Davon wurden je 4 mal 250 μ l in Minivials pipettiert und mit 4 ml Szintillationscocktail gezählt. Der Mittelwert aus diesen Standards wurde als 100%-Wert für die Berechnung der gesamten eingesetzten Radioaktivität zugrunde gelegt. Dieser 100%-Wert betrug 32806 dpm/ml (546,8 Bq/ml) Perfusionsmedium.

^{14}C -NDBA-Lösung II:

Für die Versuche mit 0,06% Ethanol wurde ^{14}C -NDBA (spezifische Aktivität: 7,08 mCi/mmol bzw. 262×10^6 Bq/mmol), das in 10%-igem Ethanol gelöst wurde, verwendet. Pro Apparatur wurden 300 μ l dieser ^{14}C -NDBA-Lösung (2,21 nmol/ml) zugegeben. Dies ergab in 50 ml Tyrode 30 μ l Ethanol, also eine 0,06% -ige Perfusionslösung. Es wurden, wie oben, Standards hergestellt. Dabei wurden 300 μ l ^{14}C -NDBA-Lösung in 50 ml Tyrode pipettiert; davon wurden 4 mal 250 μ l gezählt und so der 100%-Wert berechnet. Er betrug 38539,2 dpm/ml (642,3 Bq/ml) Perfusionsmedium.

4. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden ca. vier Monate alte weibliche Sprague-Dawley Ratten verwendet, deren Gewicht durchschnittlich 250 g betrug. Sie stammten aus der Süddeutschen Versuchstierfarm GmbH und Co.KG, Tuttlingen.

Die Tiere wurden bis zum Versuchstag ad libitum gefüttert (Alma Haltungsdiät H1003 für Ratten und Mäuse) und getränkt. Es wurde ihnen 24 Stunden vor Versuchsbeginn 1 ml Mazola^R-Keimöl pro 250 g Körpergewicht per Schlundsonde eingegeben.

Um festzustellen, ob es Unterschiede zwischen nüchternen und gefütterten Tieren bezüglich der Vitalitätskriterien für die Darmpräparation (Wasser-, Glucose- und Elektrolytbewegungen)

gibt, wurde einigen Tieren 17 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen, andere wurden ad libitum bis zum Versuchstag gefüttert, bekamen jedoch 24 Stunden vor dem Versuch kein Öl eingegeben.

5. Versuchsdurchführung

5.1. Operation

Der Eingriff wurde jeweils zur gleichen Tageszeit (ca. 9⁰⁰) durchgeführt, um tagesrhythmische Schwankungen auszuschließen. Die Tiere wurden unter Ethernarkose laparotomiert. Zwei ca. 10 cm lange Darmstücke von Jejunum und Ileum wurden herausgenommen. Das Jejunum wurde an der Flexura duodenojejunalis und kaudal von ihr, das Ileum an der Plica ileocaecalis und 10 cm kranial von ihr durchtrennt. In die durchtrennten Darmteile wurden Glaskanülen mit Schliff eingebunden. Die Därme wurden mit ca. 20 ml körperwarmer (38 °C) physiologischer Kochsalzlösung durchgespült. Von der Blutversorgung wurden die Därme erst ganz am Schluß abgetrennt und sofort in den Ganzglasperfusator nach Richter und Strugala (41) eingehängt.

5.2. Perfusion

Es wurde der am Anfang beschriebene Ganzglasperfusator verwendet. Einige Minuten vor Versuchsbeginn wurde die Perfusionslösung - 50 ml Tyrodelösung bei Kontrollversuchen, Leerperfusion und bei Versuchen mit 0,06%-igem Ethanol, 49,75 ml bei 0,5%-igem, 49 ml bei 2%-igem und 47,5 ml bei 5%-igem Ethanol - in die obere Kammer gefüllt und rezirkuliert, um das Medium auf 38 °C zu erwärmen und eine optimale Sauerstoffanreicherung zu erzielen. Die untere Kammer wurde mit dem Spitzglas zum Auffangen des Resorbates und dem befeuchteten Filterpapierstreifen versehen. Nach Einhängen der Darmsegmente und Überprüfung der Dichtigkeit des Darmes wurden die untere Kammer verschlossen und die Perfusionslösung durch den Darm geleitet. Bei einem 10 cm langen Darmstück betrug der Abstand zwischen dem Flüssig-

keitspegel in der oberen Kammer und dem unteren Ende des Darmes ca. 25 cm. Der Perfusionsdruck belief sich daher auf ca. 25 cm Wassersäule. Durch das Perfusionsmedium angefeuchtetes und gewärmtes Carbogengemisch strömte durch den Teflonschlauch in die untere Kammer und gewährleistete so die Sauerstoffversorgung des Darmes auch von außen. Von dort wurde das Gas durch vier Waschflaschen geleitet, von denen die zwei ersten je 15 ml Butanol, die dritte 15 ml Methoxyethylamin und die vierte 15 ml Aqua dest. enthielten.

Nachdem die beiden Kammern dicht verschlossen waren, wurde bei den Versuchen mit 5%-igem Ethanol 2,5 ml, mit 2%-igem Ethanol 1 ml und mit 0,5%-igem Ethanol 250 µl Ethanol zugesetzt; gleichzeitig wurde das Nitrosamin (je nach Lösung 50 µl oder 300 µl) dazugegeben.

Nach zweistündiger Perfusionsdauer ließ man das Perfusionsmedium wieder rezirkulieren, entfernte die Waschflaschen und öffnete die untere Kammer. Der Darm wurde an einer Seite durchgeschnitten; das durch den Darm ablaufende Perfusat wurde aufgefangen und die Länge des Darmes gemessen. Die Perfusat- und die abgetropfte Resorbatmenge wurden gewogen. Für die Radioaktivitätsmessung wurden beim Perfusat Doppelproben von 250 µl und beim Resorbat einmal 50 µl entnommen und mit 4 ml Szintillationscocktail aufgefüllt. Für die Glucosebestimmung wurden vom Resorbat 10 µl und vom Perfusat 30 µl, für die Elektrolytjeweils 50 µl und für die HPLC-Analytik 1100 µl vom Perfusat und 800 µl vom Resorbat entnommen. Anschließend wurde der Darm mit ca. 10 ml Aqua dest., das in einem 50 ml Meßzylinder aufgefangen wurde, gespült und abgenommen. Das Fett an seinem Gekröseansatz wurde abpräpariert; die Mucosa wurde mit Hilfe einer Pinzette aus dem Darm ausgestreift und gewogen. Nun wurden, um die Apparatur zu spülen, zweimal Methanol in die obere Kammer gefüllt und der Teflonschlauch mit etwas Methanol durchgespült. Das ganze Methanol wurde in dem gleichen 50 ml Meßzylinder aufgefangen, wie vorher das Aqua dest., mit dem der Darm gespült worden war. Aus diesem Meßzylinder, sowie aus den bei-

den Butanolwaschflaschen wurden je 5 ml zur Radioaktivitätsbestimmung entnommen und mit 8 ml Szintillationscocktail aufgefüllt. Da das in der dritten Waschflasche befindliche Methoxyethylamin flüchtig ist, wurden der nach zweistündiger Perfusion noch vorhandene Teil mit Aqua dest. auf ein definiertes Volumen von 20 ml aufgefüllt und davon ebenfalls 5 ml für die Radioaktivitätsmessung herangezogen.

In den ersten Versuchen wurde in der Wasserwaschflasche ebenfalls die Radioaktivität bestimmt; sie unterschied sich nicht deutlich vom Nullwert. Deshalb wurde in späteren Versuchen auf die Messung verzichtet.

Die Darmmucosa wurde mit 1,5 ml pH 2-Puffer gepottert; davon wurden 2 x 50 µl für die Bestimmung der Gesamtradioaktivität genommen. Der Rest des Darmhomogenates wurde in Polypropylenröhrchen eingefroren.

5.3. Blindversuch

Eine Versuchsserie wurde mit ^{14}C -NDBA-haltigem Perfusat aber ohne Darm durchgeführt. Die Perfusionslösung zirkulierte zwei Stunden. Danach wurde für die Radioaktivitätsbestimmung von Perfusat und Waschflasche wie in 5.2. beschrieben vorgegangen.

5.4. Kontrollversuche

Von nüchternen Tieren wurden je 7 Darmsegmente von Jejunum und Ileum, von gefütterten (jedoch ohne Ölgabe 24 Stunden vor Versuch) 7 von Jejunum und 6 von Ileum ohne Zusatz von Nitrosaminen perfundiert.

Mit einer aus 5%-igem Ethanol bestehenden Perfusionslösung wurden 3 Darmsegmente vom Jejunum und 4 vom Ileum ohne Zusatz von Nitrosamin perfundiert.

Am Versuchsende wurde bei Perfusat und Resorbat der Glucose- und Elektrolytgehalt bestimmt.

6. Analytik

6.1. Glucosebestimmung

10 µl Resorbat und 30 µl Perfusat, Tyrode und Glucosestandardlösung wurden in Reaktionsgefäßen mit 200 µl Perchlorsäure (0,33 mol/l) enteiweißt. Danach wurde ca. 1-2 Minuten geschüttelt und 5 Minuten zentrifugiert (10000 g). Vom Überstand wurden 100 µl abpipettiert und mit 4 ml Lösung II der Glucose GOD-Perid^R - Methode (Boehringer) angesetzt. Nach 30 Minuten wurde die Glucose am Photometer in Absaugküvetten mit 1 cm Schichtdicke bei 578 nm gegen den Leerwert bestimmt.

6.2. Elektrolytbestimmung

Die Elektrolyte Na, K und Ca wurden in jeweils 50 µl des Resorbates, Perfusates und der Tyrode nach Zugabe von 2,5 ml Lithiumverdünnung (5 mmol/l) an einem Eppendorf Flammenphotometer gemessen.

6.3. Radioaktivitätsbestimmung

Am Szintillationszähler wurden durch externe Standardisierung zwei Quenchkurven erstellt und abgespeichert. Dies geschah, indem man zu 4 ml bzw. 15 ml Cocktail mit bekannter Radioaktivitätsmenge steigende Mengen von Methoxyethylamin zugab. Alle zu untersuchenden Proben wurden entweder mit 4 ml (Minivials) oder mit 8-16 ml (Maxivials) Szintillationscocktail versehen und gemessen.

6.4. Untersuchung auf kovalente Bindung von Radioaktivität im Darmgewebe

Die Darmhomogenate von jeder Versuchsserie wurden getrennt nach Jejunum und Ileum in 13 ml Polypropylenröhrchen zusammengeschüttet. Daraus wurden ca. 3 ml Homogenat in 10 ml Zentrifugenröhrchengläser mit Schraubdeckel eingewogen. Zur Fällung der Proteine wurde 5 ml Ethanol zugegeben; das Fällungsgemisch wurde kräftig geschüttelt, 10 Minuten bei 4500 Umdrehungen

(5000 g) zentrifugiert, und der wäßrige Überstand abgenommen. Das übriggebliebene Pellet wurde auf die gleiche Weise wie oben beschrieben noch einmal mit 5 ml Ethanol, zweimal mit 5 ml Ether und dreimal mit 5 ml eines Ethanol-Wassergemisches (8/2, v/v) extrahiert. Die Radioaktivität der Extrakte wurde jeweils bestimmt. Am Ende befanden sich nur noch minimale Radioaktivitätswerte in dem wässrigen Überstand. Dem Pellet wurde nun 3 ml Gewebelöser (Protosol^R) zugegeben. Das Gemisch wurde geschüttelt und über Nacht stehengelassen. Am nächsten Tag wurden die gelösten Proteine mit 15 ml Cocktail gemischt und die Radioaktivität bestimmt.

6.5. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Um die Wirkung des Ethanols auf den Darmstoffwechsel und auf die damit verbundenen einzelnen Metaboliten zu untersuchen, wurden die Proben von Resorbat und Perfusat einer analytischen Trennung mittels HPLC unterzogen. Es konnten im wesentlichen, neben der Originalsubstanz, zwei Fraktionen aufgetrennt werden, die durch W. Zwickenpflug in seiner Diplomarbeit (44) als carboxylgruppenenthaltende saure Fraktion und als hydroxylgruppenenthaltende neutrale Fraktion identifiziert wurden.

Bereits in einer früheren Arbeit von Richter-Cooberg (40) wurden die Proben nach Versuchen mit NDBA auf einer Vorsäule aufkonzentriert. Dadurch war es möglich, größere Volumina (bis zu 4 ml) von Resorbaten und Perfusaten, die ja nicht allzuviel Proteine oder Verunreinigungen enthielten, unbehandelt (also unfiltriert) aufzugeben. Dadurch wurden nicht nur die Nachweismempfindlichkeit gesteigert, sondern verlustreiche Extraktionsmethoden vermieden, die zudem eine erhöhte Kontaminationsgefahr mit den Cancerogenen bedeuten würden.

In dem Wasser, mit dem die Vorsäule gespült worden war, befanden sich jedoch relativ hohe Radioaktivitätsmengen, die durch die kleine Vorsäule nicht zurückgehalten werden konnten. Es handelte sich dabei in der Hauptsache um den wasserlöslichen Säureanteil. Die Proben wurden deshalb mit einem Puffer angesäuert aufkonzentriert. Dadurch wird die Dissoziation der Säu-

remetaboliten zurückgedrängt ($\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{COOH}$), sie werden lipophiler und dadurch auf der Vorsäule besser zurückgehalten. Das Spülen der Vorsäule wurde mit Hilfe einer zweiten Pumpe durchgeführt, bei der als Laufmittel Puffer 1 (pH2) verwendet wurde.

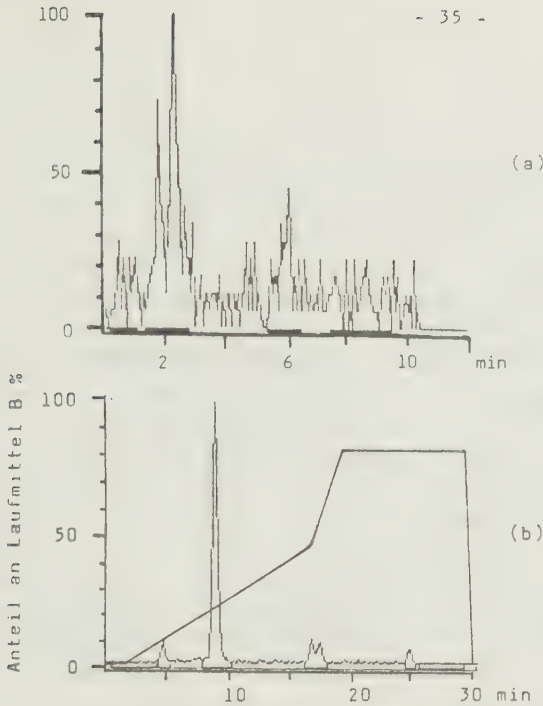
Die Trennung von NDBA von seinen Metaboliten erfolgte in den früheren Arbeiten isokratisch mit einem Acetonitril-Wassergemisch über eine 12,5 cm lange RP18-Säule (Partikelgröße 5 μm). Es wurde jedoch nur auf das Verhältnis zwischen Gesamtmetabolitenanteile und Originalsubstanz Wert gelegt, so daß die einzelnen Metabolitenanteile nicht aufgetrennt wurden (Abb. 5a). Die weitergehende Fraktionierung ist jedoch bei der Fragestellung der vorliegenden Arbeit besonders wichtig, denn es sollte ja geprüft werden, ob bei einer möglichen Wechselwirkung mit Ethanol nur der Gesamtstoffwechsel von NDBA oder auch dessen Metabolitenmuster verändert wird.

Um eine bessere Trennung zu erreichen, hätte man zunächst die Analyse mit einem geringeren Anteil an apolarem Laufmittel durchführen können. Dies hätte aber den Nachteil, daß sich die Reaktionszeit für die Ausgangssubstanz erheblich verlängert. Die Nachweisempfindlichkeit wäre dann aber aus zwei Gründen deutlich verschlechtert worden. Einmal verschlechtert sich mit zunehmender Retentionszeit das Verhältnis zwischen Peakhöhe und Peakbreite, d.h. die Peaks werden immer flacher und dadurch schlechter integrierbar. Zum anderen nimmt aufgrund begrenzter Speicherkapazitäten bei der Computerauswertung des Radioaktivitäts-Monitors die Nachweisempfindlichkeit pro 17 Minuten als Zeiteinheit jeweils um die Hälfte ab. Durch Einsatz eines Gradientenformers, durch den die Konzentration des Laufmittels im Verlauf der Analyse verändert werden kann, wird es möglich, die Analysenzeit erheblich zu verkürzen. Man beginnt mit einem geringeren Anteil des apolaren Laufmittels, so daß zunächst eine gute Trennung der hydrophileren Metaboliten möglich ist. Durch Erhöhung des Anteils des apolaren Laufmittels wird dann aber das weniger hydrophile NDBA sehr rasch von der Säule eluiert.

Mit Hilfe von tiefgefroren aufbewahrten Proben der früheren Arbeit von Richter-Cooberg (40) wurde jetzt ein Gradientenprogramm optimiert, welches eine möglichst gute Trennung der Metaboliten gewährleistete. Zunächst mußte das Wasser des Elutionsgemisches durch einen Puffer (pH 6,8) ersetzt werden, um den sauren pH von der Aufkonzentrierung auf der Vorsäule abzupuffern. Ohne diese pH-Verschiebung zurück in den neutralen Bereich bleiben die sauren Metaboliten sehr nahe bei den neutralen Metaboliten und können nicht befriedigend abgetrennt werden. Es zeigte sich, daß die Trennleistung der bisher verwendeten 12,5 cm langen RP-18-Säule nicht ausreichte, so daß zu einer doppelt so langen Säule gegriffen werden mußte, die zusätzlich mit einer 2 cm langen Vorsäule versehen war. Auf dieser Säule reichte wiederum die Elutionskraft des Acetonitrils nicht aus, um das NDBA nach Auftrennung der letzten Metaboliten schnell genug von der Säule zu eluieren. Dies erzielte man mit Ethanol, das aber bald darauf aus Kostengründen durch ein Methanol-Propanolgemisch (6/4,v/v) mit etwa dem Ethanol vergleichbarer Elutionskraft ersetzt wurde. Abb. 5b zeigt ein typisches Chromatogramm. Die Hydroxidfraktion trennt sich nur unvollständig in zwei Peaks, deren erster dem ω -Oxidationsprodukt BBN und deren zweiter dem BBN-3 (ω -1-Oxidation) zugesprochen werden kann. Obwohl es aus toxikologischen Gründen sehr interessant wäre, die Metaboliten getrennt zu bestimmen, mußte aufgrund der großen Unsicherheit bei der Auswertung darauf verzichtet werden.

Schließlich wurden die gesamte HPLC-Analyse, Probenaufgabe, Konzentrierung auf Vorsäule und analytische Trennung auf der Hauptsäule, automatisiert, um den hohen Probenanfall zu bewältigen.

Die HPLC-Anlage bestand demnach aus folgenden Teilen (Abb. 6): Automatischer Probenaufgeber mit 1 ml-Probeschleife, zwei Pumpen, Gradientenformer, VS-Schaltmodul mit zwei 1 cm Vorsäulen, Haupttrennsäule mit einer vorgeschalteten 2 cm Vorsäule, Radioaktivitätsdetektor mit angeschlossenem Computer und ein Fraktionssammler.



Nr.	Name	von	bis	Max.	NettoInhalt	%ROI's	%Gesamt
1	NULL1	0m32	4m00	----			
2	SAEURE 1	4m08	5m04	4m34	91.4	5.45 %	4.69 %
3	SAEURE 2	7m28	9m44	8m26	1303.0	77.61 %	66.86 %
4	HYDROXID	15m20	17m04	15m54	215.7	12.85 %	11.07 %
5	NDBA	23m04	23m52	23m28	68.7	4.09 %	3.53 %
6	NULL2	24m08	27m36	----			

Abb. 5 HPLC-Chromatogramme einer Resorbatprobe eines 2-Stunden mit 3,41 nmol ^{14}C -NDBA/ml perfundierten Jejunumsegmentes.

Die Proben wurden auf eine Vorsäule gegeben und mit Aqua tridest (a) bzw. Puffer pH 2 (b) gespült.

Die Elution erfolgte isokratisch (50% Acetonitril in Aqua tridest) über eine 12,5 cm lange RP-18-Säule (a) bzw. mit einem Gradientenprogramm mit Puffer pH 6,8 (A) und Methanol-/2-Propanol-gemisch, 6/4 (v/v), (B) über eine 25 cm lange RP-18-Säule (b).

Abb. 5a aus Richter-Cooberg (40)

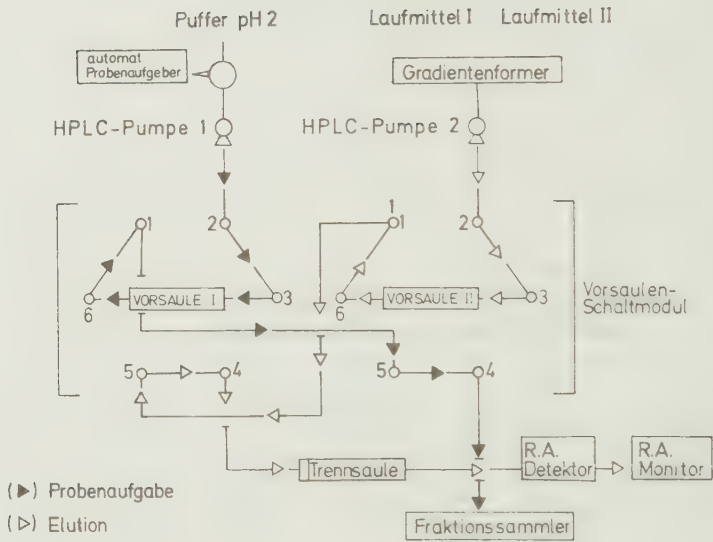


Abb. 6 Fließschema der HPLC-Anlage

1. Probenaufgabe

Die Proben, 800 μ l Resorbat und 1100 μ l Perfusat, wurden in beschriftete Ampullen pipettiert, mit pH 2-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 1300 μ l aufgefüllt. Nun wurden sie mit Bördelkappen verschlossen, gewogen und in den Probenaufgeber gestellt. Nach Starten des Probenaufgebers, gleichzeitig auch des mit ihm verbundenen Fraktionssammlers, wurden aus der Ampulle durch die Injektionsnadel ca. 1100 μ l - der genaue Wert wurde durch Wiegen der leeren Ampulle bestimmt - angesaugt und in die 1 ml-Probenschleife überführt. Das ordnungsgemäße Aufziehen konnte dadurch beobachtet werden, daß der vorher in der Schleife befindliche Puffer verdrängt und tröpfchenweise in einem Gefäß aufgefangen wurde. Die 1 ml-Probenschleife wurde um ca. 100 μ l Probe überfüllt; so wurde gewährleistet, daß keine Übertragung von einer vorherigen Probe stattfand. Die Injektionszeit betrug 40 s (bei einer schnelleren Injektionszeit kam es bei Resorbatproben zu Schaumbildung).

2. Aufkonzentrierung

Durch den pH 2-Puffer wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min die Probenschleife in entgegengesetzter Richtung, wie vorher die Probenaufgabe erfolgte, durchgespült und auf eine der beiden Vorsäulen des VS-Schaltmoduls aufkonzentriert. Die mit dem Puffer von der Konzentrierungssäule eluierte Radioaktivität wurde im Fraktionssammler (er sammelte pro Probe 6 min) als "Waste" aufgefangen. Dies war nötig, um die durch die Konzentrierungssäule nicht zurückgehaltene Radioaktivitätsmenge zu bestimmen. Nach 4 Minuten - das entspricht 2 ml Spülvolumen - wurden die Konzentrierungssäule in den Strom der Trennsäule geschaltet und gleichzeitig das Gradientenprogramm und der Integrator gestartet.

3. Analyse

Die auf der Konzentrierungssäule aufkonzentrierte Radioaktivität wurde jetzt in der gleichen Richtung durch das Laufmittel heruntergespült und mit Hilfe des Gradientenprogrammes auf der Hauptsäule einer Trennung unterzogen. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml pro Minute.

Nach der Trennung durch die Hauptsäule lief das Gemisch durch den Radioaktivitätsdetektor, der mit dem Bildschirm des Computers, auf dem sich das entwickelnde Chromatogramm zeigt, in Verbindung stand. Der pH 2-Puffer lief jetzt durch die zweite Konzentrierungssäule des Schaltmoduls und rekonditionierte diese für die nächste Probenaufgabe. Der Puffer wurde noch ca. 80 s im Fraktionssammler aufgefangen, um die Restaktivität, die sich zwischen Konzentrierungssäule und Fraktionssammler in den Kapillaren befindet, herauszuspülen. Anschließend wurde der Puffer in das Vorratsgefäß zurückgeleitet. Nach einer Analysenzeit von 32 Minuten wurden die Integration am Computer beendet und die nächste Probenaufgabe gestartet.

4. Chromatogramm

Das Chromatogramm wird nun, während die nächste Probe aufkonzentriert wird, ausgedruckt und auf einer Diskette abgespeichert.

Im Chromatogramm zeigen sich drei Hauptpeaks (Abb. 5b)

1. Fraktion der sauren Metaboliten bei ca. 10 Minuten;
(Gradientenprogramm: 45% Methanol/Propanol)
2. Fraktion der neutralen Metaboliten bei ca. 16 Minuten;
(Gradientenprogramm: 45% Methanol/Propanol)
3. NDBA bei ca. 25 Minuten;
(Gradientenprogramm: 80% Methanol/Propanol)

5. Rekonditionierung der Hauptsäule

Bereits gegen Ende der Analysenzeit (29 min) werden die Zusammensetzung des Laufmittels der Trennsäule wieder auf die Anfangsbedingungen zurückgebracht und die Säule für den nächsten Lauf konditioniert.

6. Vorsäulenschaltmodul

Mit Hilfe des VS-Moduls wurden zwei Konzentrierungssäulen jeweils abwechselnd in den Strom der Trennsäule bzw. des pH 2-Puffers zum Konditionieren und Aufkonzentrieren geschaltet.

Die beiden Vorsäulenkartuschen (10 mm lang, 30 μ m Partikelgröße) mußten nach durchschnittlich ca. 50 Proben neu gefüllt werden, weil sonst die Rückhaltekraft durch Belegung der C18-Phase mit Schmutz zu stark abnahm.

7. Waste

Der vom pH 2-Puffer von der Konzentrierungssäule eluierte "Waste" wurde mit Szintillationscocktail aufgefüllt und gezählt. Es wurde dann der 100%-Wert der gesamten pro Probe eingesetzten Radioaktivität (R.A.) durch Entnahme einer 100 μ l Probe aus der Ampulle ermittelt (100%-Wert = 10 x eingespritzte ml x R.A. der 100 μ l). An Hand dieses Wertes berechnete man dann den Prozentsatz an Waste, d.h. der Radioaktivität, der von den Vorsäulen nicht zurückgehalten werden konnte. Der Waste war bei den einzelnen Proben (bes. im Resorbat) sehr unterschiedlich; da er zu der Carboxylfraktion gerechnet wird, subtrahierte man ihn von der Gesamtradioaktivität der Probe. Dadurch ergab sich ein neuer Faktor, mit dem die im Chromatogramm ermittelten Prozentsätze der einzelnen Substanzen (siehe 7. Berechnung), korrigiert wurden. Der korrigierte Säureanteil und der Waste addiert ergaben die letztlich geltende Säurefraktion.

Diese Korrektur mußte durchgeführt werden, um bei den Proben Unterschiede in der prozentualen Metabolitenaufteilung, welche durch verschiedene Rückhaltekapazität der Konzentrierungssäule bedingt waren, auszugleichen.

In anfänglichen Versuchen wurde auch versucht, Darmhomogenat über die HPLC zu analysieren. Es war jedoch wegen des geringen Radioaktivitätsgehalts der Mucosa selbst bei Verkürzung der Analysenzeit, die verbunden ist mit einer Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit, und unter Verzicht auf eine optimale Trennleistung, nicht möglich, eine Auswertung durchzuführen. Es wurde deshalb im weiteren darauf verzichtet.

7. Berechnung der Ergebnisse

An den HPLC-Chromatogrammen wurden Regionen gesetzt, zwei Nullwerte, Säurefraktion, Hydroxidfraktion und NDBA. Diese integrierte der Computer mit Hilfe des Programms von Isomess, wobei er gleichzeitig die Nullwerte abzog. Die in der Fläche der einzelnen Peaks enthaltene Radioaktivität und der berechnete Prozentsatz an einzelnen Metaboliten wurden ausgedruckt. Die Metabolitenanteile wurden durch Multiplikation mit dem vorher aus dem Waste bestimmten Faktor korrigiert (siehe 6.5). Der Säureanteil wurde - wie oben beschrieben - durch Addition von Waste als "korrigierte Säure" bestimmt. Als Ergebnis erhielt man so das Verhältnis der Radioaktivität zwischen den einzelnen Fraktionen.

Die Untersuchungsergebnisse wurden in das Programm Multiplan eingegeben und mit diesem weiter berechnet und tabellarisch dargestellt.

Der Prozentsatz der kovalenten Bindung wurde berechnet, indem die Radioaktivität aller sieben Extraktionen und des Pellets addiert wurde. Aus diesem 100%-Wert wurde der Prozentsatz der Radioaktivität im Pellet (=kovalente Bindung) bestimmt.

8. Ergebnisse

8.1. Vitalitätskriterien

Die nach einer modifizierten Methode von Fisher und Parsons (42) isoliert durchströmten Darmsegmente (41) wurden auf ihre Lebensfähigkeit und damit auf ihre physiologische Leistungsfähigkeit untersucht. Dazu wurden Kriterien herangezogen, die dem aktiven Transport durch die Darmwand unterliegen.

a) Glucosetransport:

Im Jejunum wird die Glucose aktiv durch die Darmwand transportiert. Dadurch kommt es zu einer Anreicherung von Glucose im Resorbat; dies drückt sich in einem hohen S/M-Quotienten, d.h. in einem hohen Verhältnis zwischen der Konzentration auf der Serosa- (=Resorbat) und Mucosaseite (=Perfusat) aus. Nachdem festgestellt worden war, daß bei S/M-Quotienten unter drei ein Effekt auf die Verstoffwechslung von NDBA nicht mehr sicher auszuschließen war, wurden Ergebnisse von solchen Jejunumsegmenten nicht zur Auswertung herangezogen.

b) Natriumtransport:

Das Natrium wird durch den Darm ebenfalls aktiv, also "berg-auf" transportiert. Als Folge davon kommt es zu einer Wasserverschiebung von der Mucosa- zur Serosaseite.

8.1.1. Vitalitätskriterien bei nüchternen, gefütterten und mit Öl vorbehandelten Ratten

Als erstes wurden die Vitalitätskriterien von nüchternen, gefütterten und gefütterten Ratten, die zusätzlich Öl erhielten, untersucht (Tab.1). Die Unterschiede zwischen gefütterten Tieren und solchen, die außer dem Futter 24 Stunden vor Versuchsbeginn noch Öl erhalten hatten, waren in allen Kriterien nicht signifikant.

Bei den nüchternen Tieren war im Jejunum der S/M-Quotient für Glucose im Vergleich zu den gefütterten und den mit Öl vorbehandelten Tieren signifikant erhöht, während die pro cm Darm

Tabelle 1 Einfluß vom Fütterungszustand auf die Vitalitätskriterien isoliert perfundierter Dünndarmsegmente der Ratte

Jejunum und Ileumsegmente von ca. 8-10 cm Länge wurden 2 Stunden im Ganz-glasperfusator (41) perfundiert.

Vor Entnahme der Darmsegmente wurden die Ratten entweder 17 Stunden nüchtern gesetzt, ad libitum gefüttert oder zusätzlich zur Fütterung 24 Stunden vor Versuchsbeginn mit einer Dosis von 1 ml Öl/250 g Körpergewicht behandelt. Bei den mit Öl vorbehandelten Ratten wurde dem Perfusionsmedium zu Versuchsbeginn 2 nmol/ml 14-C-NDBA zugesetzt.

Die Zahlenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

- a: Pro cm Darm übergetretene Glucose- bzw. Na-Menge
- b: Verhältnis zwischen der Glucose- bzw. Na-Konzentration am Versuchsende im Resorbat (S=Serosaseite) und im Perfusat (M=Mucosaseite)
- c: Pro cm Darm übergetretene Wassermenge (Resorbat)
- d,e: Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Werte von einem Darmsegment innerhalb einer Säule unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$).

Vorbe- handlung	n	G L U C O S E		N A T R I U M		Wasser- transport
		(μ mol/cm) ^a	S/M ^b	(mmol/cm) ^a	S/M ^b	
JEJUNUM						
nüchtern	7	14,77±0,12	6,75±0,57 ^d	28,0±1,9 ^d	0,87±0,05	230,1± 7,7
gefüttert	7	12,20±4,11	4,41±0,43 ^e	37,1±2,5 ^e	0,90±0,01	270,5±20,8
Öl	8	15,33±1,15	4,43±0,43 ^e	35,9±2,9 ^e	0,95±0,02	248,1±13,6
ILEUM						
nüchtern	7	1,14±0,18	0,47±0,10	28,70±1,1	1,08±0,03 ^d	187,0± 7,8 ^d
gefüttert	6	1,53±0,41	0,81±0,16	22,75±1,7	1,04±0,13 ^{de}	145,4±19,5 ^e
Öl	7	1,58±0,39	0,77±0,12	18,10±4,0	0,98±0,03 ^e	121,5±25,0 ^e

übergetretene Natriummenge signifikant erniedrigt war. Die übrigen Werte zeigten keine deutlichen Veränderungen. Im Ileum war der Glucosetransport nicht signifikant verändert. Die Tendenz führte im Gegensatz zum Jejunum zu niedrigeren Glucosewerten (S/M-Quotienten, $\mu\text{mol}/\text{cm}$) bei nüchternen Ratten, im Vergleich zu den gefütterten und mit Öl vorbehandelten Tieren. Der Natriumtransport war, wiederum im Gegensatz zum Jejunum, bei den nüchternen Ratten signifikant erhöht. Deshalb war auch der Wassertransport bei diesen Tieren signifikant erhöht.

8.1.2. Vitalitätskriterien bei den einzelnen Ethanolkonzentrationen

Für die Versuche mit Ethanol wurden im weiteren nur Tiere verwendet, die bis zum Versuchstag gefüttert und 24 Stunden vor Versuchsbeginn mit Öl peroral vorbehandelt worden waren.

In einem Vorversuch ohne NDBA wurde der Einfluß von einer Ethanolkonzentration von 5% im Perfusionsmedium getestet (Tab.2). In Jejunumsegmenten erwies sich die hohe Ethanolgabe als eindeutig toxisch. Sowohl die Glucoseresorption als auch der Wasser- und Elektolyttransport waren hoch signifikant reduziert. Deshalb wurde bei dieser Konzentration kein Versuch mit NDBA unternommen. In Ileumsegmenten hatte die hohe Ethanolkonzentration keinen Einfluß auf die von uns bestimmten Vitalitätskriterien.

Bei den Untersuchungen über die Wechselwirkung von Ethanol mit der intestinalen Verstoffwechslung von NDBA zeigte sich, daß niedrige Ethanolkonzentrationen (0,06% und 0,5% im Perfusat) die physiologischen Stoffwechselleistungen des Darmes nicht beeinträchtigen (Tab.2). Es wurde sogar eine Tendenz zu erhöhtem Glucosetransport, signifikant bei Jejunum mit 0,5%, bei Ileum mit 0,06%, und zu erhöhter Glucoseanreicherung (S/M-Quotient), signifikant bei Ileum mit 0,5%, gesehen. Hinsichtlich des Wasser- und Elektolyttransportes waren bei beiden Darmabschnitten keine signifikanten Veränderungen zu beobachten. Dies gilt auch für die Untersuchungen mit der höchsten Ethanolkonzentration (2% im Perfusat), die im Zusammenhang mit

Tabelle 2 Einfluß von Ethanol auf die Vitalitätskriterien isoliert durchströmter Dünndarmsegmente

Jejunum- und Ileumsegmente von ca. 8-10 cm Länge wurden 2 Stunden im Ganzglas-Perfusator (41) mit einer Perfusionslösung durchströmt, die 14-C-NDBA (2 nmol/ml) und unterschiedliche Ethanolkonzentrationen (v/v) enthielt. Bei 5% -igem Ethanolzusatz wurde kein 14-C-NDBA zugesetzt.

Die Zahlenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

- a: Pro cm Darm übergetretene Glucose- bzw. Na-Menge
b: Verhältnis zwischen der Glucose- bzw. Na-Konzentration am Versuchsende im Resorbat (S=Serosaseite) und im Perfusat (M=Mucosaseite)
c: Pro cm Darm übergetretene Wassermenge (Resorbat)
d-g: Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Werte von einem Darmsegment innerhalb einer Säule unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$).

Ethanol (%)	n	GLUCOSE		N A T R I U M		Wasser-transport (μ /cm) ^c
		(μ mol/cm) ^a	S/M ^b	(mmol/cm) ^a	S/M ^b	
JEJUNUM						
0	8	15,33 $\pm$ 1,15 ^d	4,43 $\pm$ 0,43 ^{df}	35,9 $\pm$ 2,9 ^{de}	0,95 $\pm$ 0,02 ^d	248,1 $\pm$ 13,5 ^d
0,06	12	16,22 $\pm$ 1,36 ^{de}	5,03 $\pm$ 0,34 ^d	31,4 $\pm$ 2,2 ^d	0,94 $\pm$ 0,04 ^d	234,3 $\pm$ 15,1 ^d
0,5	6	20,31 $\pm$ 1,91 ^e	4,79 $\pm$ 0,41 ^d	41,3 $\pm$ 5,2 ^{de}	0,94 $\pm$ 0,04 ^{de}	274,6 $\pm$ 22,3 ^d
2	7	11,30 $\pm$ 1,49 ^f	3,32 $\pm$ 0,16 ^e	33,6 $\pm$ 3,8 ^{de}	0,99 $\pm$ 0,03 ^{de}	241,1 $\pm$ 29,2 ^d
5	3	4,79 $\pm$ 1,01 ^g	2,97 $\pm$ 0,08 ^{ef}	11,1 $\pm$ 0,5 ^f	1,04 $\pm$ 0,03 ^e	103,3 $\pm$ 17,5 ^e
ILEUM						
0	7	1,58 $\pm$ 0,39 ^d	0,77 $\pm$ 0,12 ^{df}	18,1 $\pm$ 4,0	0,98 $\pm$ 0,03 ^{de}	121,5 $\pm$ 25,0
0,06	8	3,49 $\pm$ 0,55 ^e	1,16 $\pm$ 0,16 ^{de}	27,0 $\pm$ 3,5	0,96 $\pm$ 0,04 ^{de}	186,0 $\pm$ 22,4
0,5	7	2,92 $\pm$ 0,67 ^{de}	1,21 $\pm$ 0,08 ^e	20,3 $\pm$ 4,3	0,99 $\pm$ 0,02 ^d	136,7 $\pm$ 30,2
2	8	2,18 $\pm$ 0,65 ^{de}	0,56 $\pm$ 0,09 ^f	30,4 $\pm$ 5,1	1,07 $\pm$ 0,03 ^{de}	167,9 $\pm$ 16,9
5	4	2,28 $\pm$ 0,94 ^{de}	0,66 $\pm$ 0,14 ^{def}	19,3 $\pm$ 6,5	1,07 $\pm$ 0,01 ^e	128,2 $\pm$ 46,3

NDBA getestet wurde. Im Gegensatz dazu war bei den Jejunumsegmenten bei dieser Konzentration eine signifikante Reduktion der Glucoseverschiebung zur Serosaseite festzustellen, die in ihrem Ausmaß genau zwischen den Kontrollwerten und den mit 5% Ethanol erhaltenen Werten liegt. Bei den Ileumsegmenten beschränkte sich die Reduktion der Glucoseverschiebung auf den Rückgang der bei niedrigen Ethanolgaben gesehenen Erhöhung auf die Kontrollwerte.

8.2. Stoffwechsel von NDBA ohne Ethanolzusatz

Die Versuche wurden bei einer NDBA-Konzentration von 2 nmol/ml Perfusionslösung durchgeführt. Bei dieser Konzentration war die Verstoffwechslung des NDBA durch den Darm sehr hoch.

Die Darmabschnitte reicherten die Radioaktivität im Resorbat an. Bei Jejunum bzw. Ileum wurden 5,3 mal bzw. 2,5 mal höhere Konzentrationen im Resorbat als im Perfusat gemessen (S/M-Quotienten für Gesamtradioaktivität in Tab.6). Für diese Anreicherung war nicht das NDBA selbst verantwortlich, denn es fand sich bei beiden Darmabschnitten eine höhere NDBA-Konzentration im Perfusat als im Resorbat (S/M-Quotient 0,6). Die Konzentration der auf alle Metaboliten entfallenden Radioaktivität war dagegen im Resorbat 15 mal (Jejunum) bzw. 5 mal (Ileum) höher als im Perfusat.

Während der Resorption wurden im Jejunum 92%, im Ileum 86% des NDBA verstoffwechselt (Tab.5). Daneben wurden auch Metaboliten an das Perfusat abgegeben. Dies führte zu einem Metabolitenanteil von 33% bzw. 43% bei Jejunum bzw. Ileum (Tab.3). Außerdem entstand ^{14}C -markiertes Kohlendioxid (Tab.4), welches in der dritten Waschflasche mit Methoxyethylamin aufgefangen wurde. Die Gesamtverstoffwechselungsrate betrug bei beiden Darmabschnitten ca. 34%. Während sich beim Ileum der überwiegende Anteil der Metaboliten im Perfusat (92%) befand und fast kein Kohlendioxid (0,6%) gebildet wurde, enthielt beim Jejunum das Resorbat mehr als ein Drittel (35%) der insgesamt gebildeten Metaboliten, die Kohlendioxid absorbierende Waschflasche

ca. 3%. Die kovalente Bindung von Radioaktivität an die Proteine der Mucosa war beim Jejunum ebenfalls deutlich höher als beim Ileum.

Diese Werte bestätigten im wesentlichen frühere Untersuchungen, die Richter-Cooberg (40) an nüchternen Ratten und bei vergleichbaren NDBA-Konzentrationen erhalten hatte.

Um nun besser entscheiden zu können, ob es sich bei der Metabolisierung um eine Giftung oder Entgiftung handelt, und im Hinblick auf die späteren Untersuchungen über die Wechselwirkungen des NDBA mit Ethanol war es nötig, die entstehenden einzelnen Metaboliten besser aufzutrennen. Durch Einführung und Optimierung eines Gradientenprogrammes, Verwendung einer 25 cm langen RP18-Säule und Veränderung des Lösungsmittelgemisches konnte die bei Richter-Cooberg verwendete HPLC-Analytik (Abb. 5a) deutlich verbessert werden, so daß es möglich wurde, die carboxylgruppenenthaltende und die hydroxylgruppenenthaltende Metabolitenfraktion gut voneinander zu trennen. Die Abbildungen (7a, 8a, 9a, 10a) zeigen typische Chromatogramme von Resorbat- und Perfusatproben nach zweistündiger Perfusion mit NDBA.

Im Resorbat des Jejunum entfielen mehr als 90% der Metaboliten auf die Säurefraktion, fast doppelt soviel wie im Perfusat (50%) (Tab. 5). Beim Ileum sind schon im Resorbat nur etwas mehr als 50% saure Metaboliten zu finden, im Perfusat nur noch 20%. Insgesamt verstoffwechselte das Jejunum 21,36% des gesamten eingesetzten NDBA zu sauren Metaboliten, das Ileum nur 8% (Tab. 4).

8.3. Einfluß von verschiedenen Ethanolkonzentrationen auf den Stoffwechsel von NDBA

Es wurden drei verschiedene Ethanolkonzentrationen (0,06%, 0,5% und 2%, v/v) im Perfusionsmedium untersucht. Bei den Versuchen mit 0,5%- und 2%-iger Lösung wurde soviel Ethanol gleichzeitig mit dem NDBA in das Perfusionsmedium gegeben, daß es eine Ethanolkonzentration von 0,5% und 2% erhielt. Bei 0,06% wurde eine andere NDBA-Standardlösung verwendet, bei der das NDBA bereits in Ethanol gelöst war.

Tabelle 3 Prozentuale Verteilung der Radioaktivität nach Perfusion mit ^{14}C -NDBA^a

Jejunum und Ileumsegmente von ca. 8-10 cm Länge wurden 2 Stunden im Ganzglas-perfusator (41) mit einer Perfusionslösung durchströmt, die ^{14}C -NDBA (2 nmol/ml) und unterschiedliche Ethanolkonzentrationen (v/v) enthielt.

Die Zahlenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

a: Radioaktivitätsmenge in Prozent der eingesetzten Gesamtradioaktivität
b-e: Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Werte von einem Darmsegment innerhalb einer Säule unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$).

Ethanol (%)	n	Perfusat	Resorbat	Darm	Waschflaschen	
					Butanol	CO ₂
LEER-PERFUSION (ohne Darm)						
0	9	61,08±2,26	----	----	33,90±7,88	0,01±0,00
JEJUNUM						
0	8	63,57±1,01	13,02±1,07 ^b	1,68±0,19 ^b	11,90±1,44	1,01±0,11 ^b
0,06	12	61,22±1,78	9,64±0,66 ^c	0,99±0,11 ^c	12,28±2,16	1,81±0,25 ^c
0,5	6	59,25±3,47	12,12±0,88 ^b	1,82±0,28 ^b	14,63±2,04	1,07±0,10 ^b
2	7	66,31±2,09	5,58±0,81 ^d	1,44±0,21 ^b	15,48±2,02	1,02±0,14 ^b
ILEUM						
0	7	70,50±3,69 ^b	3,02±0,67 ^b	1,31±0,34 ^{bc}	11,19±1,24 ^b	0,18±0,23 ^b
0,06	8	74,88±2,35 ^b	4,90±0,98 ^c	0,71±0,10 ^b	13,87±1,76 ^b	0,80±0,16 ^c
0,5	7	64,68±4,61 ^{bc}	2,74±0,67 ^b	1,34±0,13 ^c	14,01±2,32 ^b	0,09±0,02 ^d
2	8	61,25±1,56 ^c	2,19±0,33 ^b	1,28±0,18 ^c	22,41±1,62 ^c	0,06±0,01 ^e

Tabelle 4 Summe der vom Darm gebildeten gesamten Metaboliten und sauren Metaboliten nach Perfusion mit ^{14}C -NDBA

Jejunum und Ileumsegmente von ca. 8-10 cm Länge wurden 2 Stunden im Ganzglasperfusator (41) mit einer Perfusionslösung durchströmt, die ^{14}C -NDBA (2 nmol/ml) und unterschiedliche Ethanolkonzentrationen (v/v) enthielt. Die Zahlenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_x$).

a, b: Radioaktivitätsmenge in Prozent der eingesetzten Dosis, die auf die Gesamtmetabolitenfraktion (a) bzw. die sauren Metaboliten (b) entfiel.

c: Summe der Metaboliten aus Perfusat, Resorbat und der CO_2 -absorbierenden Waschflasche

d: Summe der sauren Metaboliten aus Perfusat und Resorbat

e-h: Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Werte von einem Darmsegment innerhalb einer Säule unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$).

Ethanol (%)	n	Perfusat		Resorbat		CO ₂	Summe der	
		gesamte Metaboliten ^a	saure Metaboliten ^b	gesamte Metaboliten ^a	saure Metaboliten ^b		gesamten Metaboliten ^c	sauren Metaboliten ^d
JEJUNUM								
0	8	21,11±1,34 ^e	10,28±0,29 ^e	12,04±1,02 ^e	11,08±0,97 ^e	1,01±0,11 ^e	34,15±1,84 ^e	21,36±1,18 ^e
0,06	12	26,51±1,52 ^f	12,57±0,94 ^e	8,80±0,59 ^f	6,50±0,79 ^f	1,81±0,25 ^f	36,92±2,74 ^e	18,87±1,49 ^{ef}
0,5	6	25,94±1,77 ^f	5,99±0,99 ^f	11,03±0,79 ^e	7,97±0,64 ^f	1,07±0,10 ^e	38,03±2,42 ^e	13,96±1,52 ^f
2	7	19,83±1,05 ^e	2,71±0,56 ^g	4,03±0,56 ^g	1,54±0,66 ^g	1,02±0,14 ^e	24,87±1,95 ^f	4,24±0,60 ^g
ILEUM								
0	7	30,25±2,65 ^e	6,20±0,96 ^e	2,61±0,62 ^e	1,52±0,41 ^e	0,18±0,23 ^e	33,05±3,07 ^e	7,73±1,21 ^e
0,06	8	39,87±2,89 ^f	9,70±1,43 ^e	4,11±0,24 ^f	1,74±0,12 ^e	0,80±0,16 ^f	44,78±2,79 ^f	11,44±1,45 ^e
0,5	7	27,28±1,55 ^e	2,14±0,30 ^f	2,19±0,52 ^{eg}	0,57±0,29 ^f	0,09±0,02 ^g	29,56±1,78 ^e	2,52±0,32 ^f
2	8	11,73±0,89 ^g	0,88±0,20 ^g	1,15±0,18 ^g	0,10±0,02 ^g	0,06±0,01 ^h	12,91±2,70 ^g	0,98±0,22 ^g

Tabelle 5 Prozentualer Anteil der gesamten Metaboliten an der Gesamtradioaktivität und prozentualer Anteil der sauren Metaboliten bezogen auf die Gesamtmetaboliten nach Perfusion mit ^{14}C -NDBA

Jejunum und Ileumsegmente von ca. 8-10 cm Länge wurden 2 Stunden im Ganzglasperfusator (41) mit einer Perfusionslösung durchströmt, die 14-C-NDBA (2 nmol/ml) und unterschiedliche Ethanolkonzentrationen (v/v) enthielt.

Die Zahlenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_x$).

a: Metabolitenanteil bezogen auf die Gesamtradioaktivität in Perfusat bzw. Resorbat

b: Anteil der sauren Metaboliten bezogen auf den Gesamtmetabolitenanteil in Perfusat bzw. Resorbat

c-f: Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Werte von einem Darmsegment innerhalb einer Säule unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$).

		P E R F U S A T		R E S O R B A T	
Ethanol (%)	n	Metaboliten- anteil (%) ^a	Anteil saurer Metaboliten (%) ^b	Metaboliten- anteil (%) ^a	Anteil saurer Metaboliten (%) ^b
J E J U N U M					
0	8	33,19±2,02 ^c	49,79±2,74 ^c	92,26±1,01 ^c	91,95±1,27 ^c
0,06	12	43,09±2,26 ^d	46,35±1,85 ^c	91,48±0,69 ^c	80,93±1,34 ^d
0,5	6	44,53±4,21 ^d	22,47±2,35 ^d	91,00±0,72 ^c	72,08±1,26 ^e
2	7	30,02±1,73 ^c	14,88±2,74 ^d	72,17±2,13 ^d	37,30±2,46 ^f
I L E U M					
0	7	42,84±2,62 ^c	19,89±1,80 ^c	85,80±1,24 ^c	56,61±2,77 ^c
0,06	8	52,96±2,84 ^d	23,06±2,01 ^c	84,58±1,60 ^{cd}	42,86±2,85 ^d
0,5	7	42,79±2,30 ^c	8,16±1,24 ^d	80,02±1,93 ^d	20,57±0,89 ^e
2	8	19,09±1,26 ^f	7,49±2,02 ^d	51,56±1,88 ^e	9,47±1,01 ^f

Tabelle 6 Transfer der Radioaktivität und der auf Originalsubstanz und Metaboliten entfallenden Anteile nach Perfusion mit ^{14}C -NDBA^a

Jejunum und Ileumsegmente von ca. 8-10 cm Länge wurden 2 Stunden im Ganzglasperfusator (4l) mit einer Perfusionslösung durchströmt, die ^{14}C -NDBA (2 nmol/ml) und unterschiedliche Ethanolkonzentrationen (v/v) enthielt.

Die Zahlenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

a: Verhältnis der Konzentrationen im Resorbat (S= Serosaseite) und im Perfusat (M= Mucosaseite)

b-d: Mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnete Werte von einem Darmsegment innerhalb einer Säule unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$).

		S / M - Q U O T I E N T		
Ethanol (%)	n	Gesamt-Radioaktivität	Originalsubstanz	Metaboliten
JEJUNUM				
0	8	5,28±0,27 ^b	0,60±0,06	15,12±1,28 ^b
0,06	12	4,05±0,40 ^c	0,62±0,08	8,82±0,84 ^c
0,5	6	4,17±0,25 ^c	0,70±0,09	8,95±0,73 ^c
2	7	1,84±0,24 ^d	0,72±0,04	4,53±0,39 ^d
ILEUM				
0	7	2,51±0,19 ^b	0,62±0,07 ^b	5,10±0,46 ^b
0,06	8	2,18±0,11 ^b	0,71±0,06 ^{bc}	3,52±0,21 ^c
0,5	7	2,14±0,14 ^b	0,78±0,13 ^{bc}	4,04±0,24 ^{bc}
2	8	1,41±0,22 ^c	0,84±0,04 ^c	3,90±0,35 ^{bc}

8.3.1. Verteilung der Gesamtradioaktivität

a) Jejunum

Im Perfusat war der Anteil der Radioaktivität an der Gesamtradioaktivität bei den einzelnen Ethanolkonzentrationen nicht verschieden von den Kontrollen (Tab.3). Der prozentuale Anteil der Radioaktivität im Resorbat verringerte sich dagegen bei Zusatz von 0,06% und 2% Ethanol zum Perfusionsmedium hoch signifikant, während bei 0,5% nur eine Tendenz zur Abnahme gegenüber den Kontrollversuchen ohne Ethanol zu verzeichnen war. Daraus resultierte auch eine signifikante Verringerung des S/M-Quotienten bei allen drei Ethanolkonzentrationen (Tab.6). Bei der hohen Konzentration nahm er im Vergleich zur Kontrolle um mehr als die Hälfte ab. Bei der niedrigsten Dosis kam es zu einer signifikanten Steigerung der Kohlendioxidproduktion (Tab.3). Bei den beiden höheren Ethanolkonzentrationen wurde die Kohlendioxidproduktion nicht beeinflusst. Die kovalente Bindung betrug bei der Kontrolle 0,63% der Radioaktivität im Darm, bei 0,5% Ethanol 0,89% und bei 2% Ethanol 0,96%. Es zeigte sich dosisabhängig ein leichter Anstieg in der kovalenten Bindung.

b) Ileum

Im Ileum war die Gesamtradioaktivität im Resorbat bei der niedrigsten Ethanoldosis signifikant im Vergleich zur Kontrolle und zu den anderen Ethanolkonzentrationen erhöht (Tab.3). Bei 2%-igem Ethanol war eine Tendenz zur Abnahme zu erkennen. Das Perfusat wies hinsichtlich der Gesamtradioaktivität keine signifikanten Veränderungen auf, jedoch war wie beim Resorbat bei 2% Ethanol eine Verringerung in der Radioaktivitätsmenge zu verzeichnen. Der S/M-Quotient war bei 2% Ethanol signifikant erniedrigt. Die Kohlendioxidproduktion erhöhte sich bei der niedrigsten Ethanolkonzentration um das 4,5-fache und damit noch deutlicher als beim Jejunum. Bei den höheren Dosen (0,5% und 2%) verringerte sie sich im Gegensatz zum Jejunum mit ansteigender Ethanolkonzentration um die Hälfte bzw. um zwei

Drittel (Tab.3,5). Die kovalente Bindung war nicht verändert. Sie betrug 0,2% bei den Kontrollen und 0,18% bzw. 0,23% der gesamten Radioaktivität im Darm bei 0,5% bzw. 2% Ethanolzusatz.

8.3.2. Verteilung der Gesamtmetaboliten

a) Jejunum

NDBA wurde in 2%-iger Ethanolllösung wesentlich schlechter verstoffwechselt als bei niedrigeren Ethanolkonzentrationen. Der prozentuale Anteil der Metaboliten, der mittels HPLC bestimmt wurde, zeigte im Resorbat bei 2% Ethanol eine hoch signifikante Abnahme (Tab.5). Man fand im Resorbat viermal soviel Originalsubstanz wie bei den Kontrollen bei 0,06% und bei 2% Ethanol. In den Perfusaten konnten bei 0,06% und bei 0,5% signifikant mehr Metaboliten nachgewiesen werden. Bei 2% Ethanol war im Perfusat ein etwas niedrigerer Metabolitenanteil als in der Kontrolle.

Vergleicht man das Verhältnis der Konzentrationen der gesamt gebildeten Metaboliten in Resorbat und Perfusat (Tab.6), so zeigt sich, daß die Anreicherung der Metaboliten im Resorbat bei 0,06% und bei 0,5% um knapp die Hälfte und bei der hohen Ethanoldosis um fast zwei Drittel verringert war. Hinsichtlich der Originalsubstanz zeigte sich bei den beiden höheren Ethanolkonzentrationen eine Tendenz zu höheren Konzentrationen im Resorbat.

Betrachtet man die Summe der vom Darm gebildeten Metaboliten (Tab.4), dann ist bei 0,5% Ethanol eine nicht signifikante Erhöhung, bei 2% Ethanol eine deutliche Erniedrigung zu sehen. Die Erhöhung bei 0,5% Ethanol ist alleine auf das Perfusat zurückzuführen, die Verringerung bei 2% Ethanol in erster Linie auf das Resorbat. Bei 0,06% Ethanol finden sich im Resorbat weniger Metaboliten, dafür mehr im Perfusat.

b) Ileum

Auch das Ileum verstoffwechselte das NDBA in zweiprozentiger Ethanolllösung signifikant geringer als unter Kontrollbedingungen und bei den beiden niedrigeren Ethanolkonzentrationen (Tab.5). Bei den Resorbatproben war der Metabolitenanteil von 86% auf 52% reduziert, d.h. es konnte 3,5 mal soviel Originalsubstanz wie in der Kontrolle nachgewiesen werden. Im Perfusat stieg die Metabolisierungsrate zunächst bei der niedrigsten Ethanolkonzentration wieder an, war bei 0,5% gleich mit den Kontrollen und sank bei 2% Ethanol auf die Hälfte ab.

Vergleicht man das Verhältnis der Metaboliten-Konzentrationen in Resorbat und Perfusat, so zeigt sich bei allen Ethanolkonzentrationen die Tendenz zur Abnahme (Tab.6), die jedoch bei der höchsten Ethanolkonzentration nicht so deutlich ausgeprägt war wie beim Jejunum. Der S/M-Quotient für das NDBA selbst stieg dagegen dosisabhängig an (Tab.6).

Die Summe der vom Darm gebildeten Metaboliten, angegeben in Prozent der eingesetzten Dosis, war bei der niedrigsten Ethanol-dosis im Resorbat signifikant erhöht und bei der höchsten Dosis auf die Hälfte im Vergleich zu den Kontrollen reduziert. Ähnliche Verhältnisse fand man im Perfusat. 0,06% Ethanol bewirkten einen signifikanten Anstieg der Gesamtmetaboliten, während bei 2% der Gesamtmetabolitengehalt um mehr als die Hälfte verringert war (Tab.4).

8.3.3. Veränderung des Metabolitenmusters

a) Jejunum

Das Metabolitenverteilungsmuster veränderte sich dosisabhängig hoch signifikant (Tab. 5; Abb. 7,9,11b,12b). Der Darm oxidierte nach Zugabe von Alkohol ins Perfusionsmedium die gebildeten Hydroxidmetaboliten nicht mehr so stark zu Säuremetaboliten weiter. Im Resorbat stellte bei den Kontrollen die Säurefraktion den Hauptanteil (92%), die Hydroxidfraktion (8%) nur einen relativ geringen Anteil. Die niedrigste Ethanol-dosis bewirkte einen Anstieg der Hydroxide auf das 2,5-fache, während

der Anteil der Säuremetaboliten auf 81% sank. Dieses Bild verstärkte sich mit zunehmender Ethanolkonzentration, und bei 2% Ethanol war die Hydroxidfraktion (63%) bereits größer als die Säurefraktion (37%). Damit war der Hydroxidanteil im Resorbat im Vergleich zu den Kontrollen um das 8-fache erhöht.

Im Perfusat zeigten sich ähnliche Verhältnisse wie im Resorbat. Bei der niedrigsten Ethanoldosis zeigte sich eine Tendenz zur geringeren Säurebildung, während bei 0,5% und 2% signifikante Erniedrigungen im Säureanteil deutlich wurden (Tab.5). 2%-iges Ethanol verringerte den Säureanteil im Perfusat von 5% in den Kontrollen auf 15%.

Hinsichtlich der Summe der gebildeten sauren Metaboliten zeigte sich ebenfalls eine dosisabhängige Abnahme (Tab.4). Sie war bei der niedrigsten Ethanolkonzentration nur in der Tendenz erkennbar und allein durch die Erniedrigung im Resorbat bedingt. Im Perfusat war hier sogar eine leichte, nicht signifikante Erhöhung gegeben. Bei den höheren Ethanolkonzentrationen waren sowohl im Perfusat als auch im Resorbat signifikant geringere Mengen an sauren Metaboliten zu verzeichnen.

b) Ileum

Beim Ileum fand man im Resorbat, ähnlich wie beim Jejunum, nach Zugabe von Ethanol ins Medium dosisabhängig weniger Säuremetaboliten. Der Anteil der zur Säure aufoxidierten Metaboliten sank mit zunehmender Ethanolkonzentration von 57% bei den Kontrollen über 43% und 21% auf weniger als 10% bei 2%-igem Ethanol (Tab.5; Abb. 8,11a). Im Perfusat zeigten sich etwas andere Verhältnisse. Die Abnahme war insgesamt nicht so stark ausgeprägt und nur bei den beiden höheren Ethanolkonzentrationen gegeben (Abb. 10,12a). Bei der niedrigsten Ethanoldosis war der Anteil von sauren Metaboliten noch nicht signifikant verschieden.

Die Summe der vom Darm gebildeten sauren Metaboliten war bei der niedrigen Dosis erhöht, jedoch nicht signifikant. Dieser Anstieg war durch den erhöhten Gehalt der Säurefraktion im Perfusat begründet (Tab.4). In 0,5%-igem und in 2%-igem Perfu-

sionsmedium produzierte das Ileum aus dem NDBA 3- bzw. 7-mal weniger saure Metaboliten als bei den Kontrollen. Ihre Menge war sowohl im Perfusat als auch in stärkerem Ausmaß im Resorbat erniedrigt.

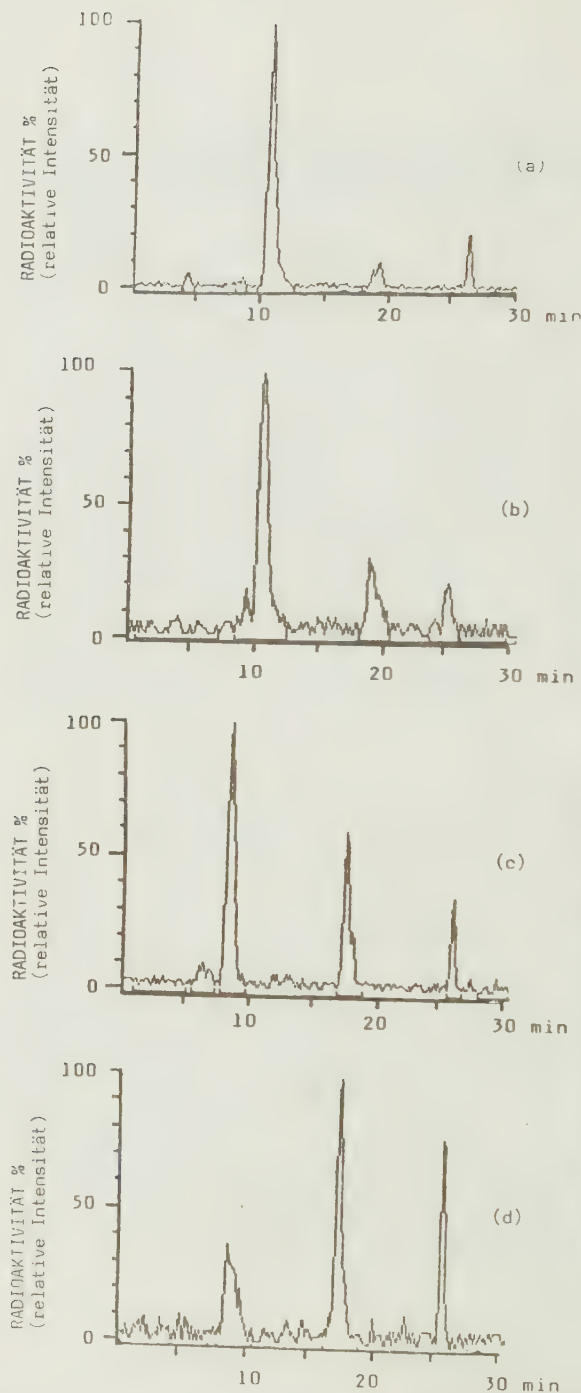


Abb. 7: HPLC-Chromatogramme von Resorbatproben von Jejunumsegmenten, die 2-Stunden mit einer Perfusionslösung durchströmt wurden, die 2 nmol/ml 14-C-NDBA und unterschiedliche Ethanolkonzentrationen 0% (a), 0,06% (b), 0,5% (c) und 2% (d) enthielt.

0,8 ml Resorbat wurden mit 0,5 ml Puffer pH 2 versetzt. Davon wurde 1 ml auf eine Vorsäule gepumpt und mit 2 ml Puffer pH 2 gespült. Die Elution erfolgte über eine 25 cm lange RP-18-Säule mit einem Gemisch aus Puffer pH 6,8 und Methanol/2-Propanol, dessen Zusammensetzung durch ein Gradientenprogramm während des Laufes verändert wurde.

Die drei Hauptpeaks stellen der Reihe nach die saure Fraktion, die neutrale Fraktion und das 14-C-NDBA dar. Dem jeweils höchsten Peak im Chromatogramm wurde eine relative Intensität von 100 % zugeordnet.

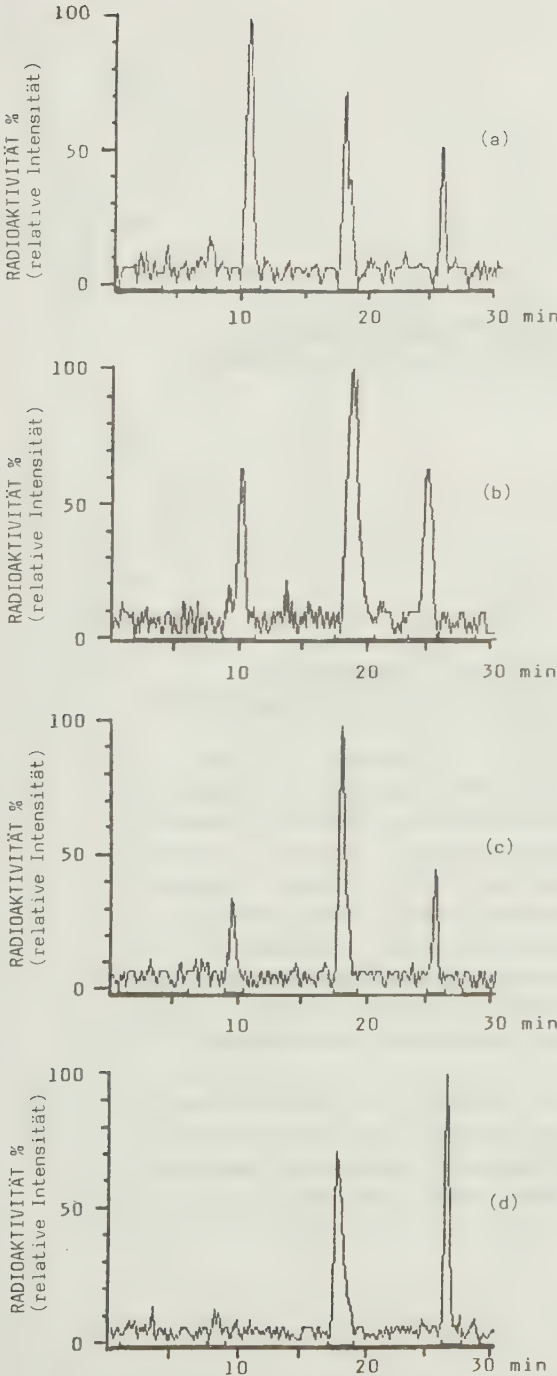


Abb. 8: HPLC-Chromatogramme von Resorbatproben von Ileumsegmenten, die 2-Stunden mit einer Perfusionslösung durchströmt wurden, die 2 nmol/ml 14-C-NDBA und unterschiedliche Ethanolkonzentrationen 0% (a), 0,06% (b), 0,5% (c) und 2% (d) enthielt.

0,8 ml Resorbat wurden mit 0,5 ml Puffer pH 2 versetzt. Davon wurde 1 ml auf eine Vorsäule gepumpt und mit 2 ml Puffer pH 2 gespült. Die Elution erfolgte über eine 25 cm lange RP-18-Säule mit einem Gemisch aus Puffer pH 6,8 und Methanol/2-Propanol, dessen Zusammensetzung durch ein Gradientenprogramm während des Laufes verändert wurde.

Die drei Hauptpeaks stellen der Reihe nach die saure Fraktion, die neutrale Fraktion und das 14-C-NDBA dar. Dem jeweils höchsten Peak im Chromatogramm wurde eine relative Intensität von 100 % zugeordnet.

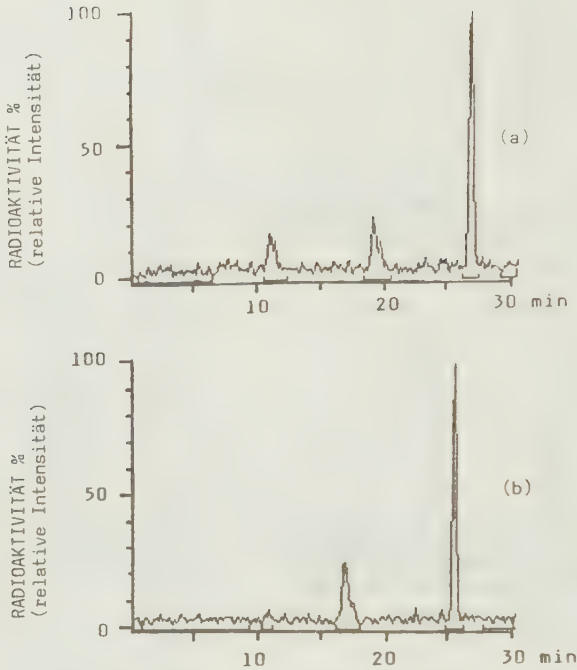


Abb. 9: HPLC-Chromatogramme von Perfusatproben von Jejunumsegmenten, die 2-Stunden mit einer Perfusionslösung durchströmt wurden, die 2 nmol/ml ^{14}C -NDBA und 0% (a) bzw. 2% (b) Ethanol enthielt.

1,1 ml Perfusat wurden mit 0,2 ml Puffer pH 2 versetzt und davon 1 ml auf eine Vorsäule gepumpt und mit 2 ml Puffer pH 2 gespült. Die Elution erfolgte über eine 25 cm lange RP-18-Säule mit einem Gemisch aus Puffer pH 6,8 und Methanol/2-Propanol dessen Zusammensetzung durch ein Gradientenprogramm während des Laufes verändert wurde.

Die drei Hauptpeaks stellen im wesentlichen die saure Fraktion, die neutrale Fraktion und das ^{14}C -NDBA dar. Dem jeweils höchsten Peak im Chromatogramm wurde eine relative Intensität von 100% zugeordnet.

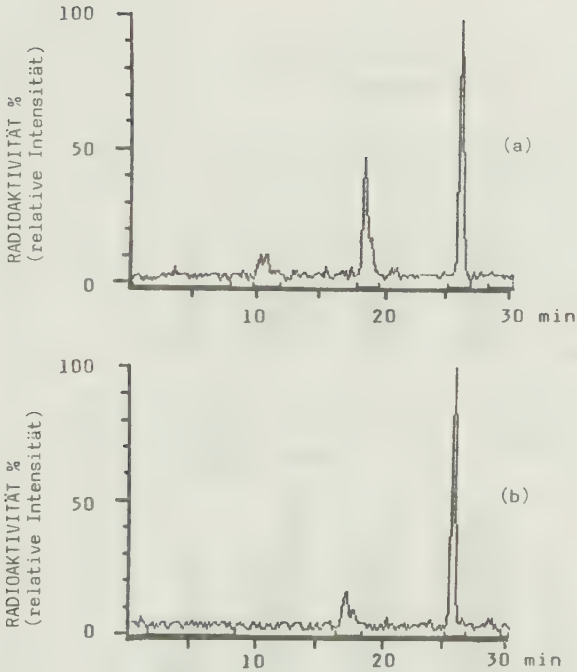


Abb. 10: HPLC-Chromatogramme von Perfusatsproben von Ileum-segmenten, die 2-Stunden mit einer Perfusionslösung durchströmt wurden, die 2 nmol/ml ^{14}C -NDBA und 0% (a) bzw. 2% (b) Ethanol enthielt.

1,1 ml Perfusat wurden mit 0,2 ml Puffer pH 2 versetzt und davon 1 ml auf eine Vorsäule gepumpt und mit 2 ml Puffer pH 2 gespült. Die Elution erfolgte über eine 25 cm lange RP-18-Säule mit einem Gemisch aus Puffer pH 6,8 und Methanol/2-Propanol dessen Zusammensetzung durch ein Gradientenprogramm während des Laufes verändert wurde.

Die drei Hauptpeaks stellen im wesentlichen die saure Fraktion, die neutrale Fraktion und das ^{14}C -NDBA dar. Dem jeweils höchsten Peak im Chromatogramm wurde eine relative Intensität von 100% zugeordnet.

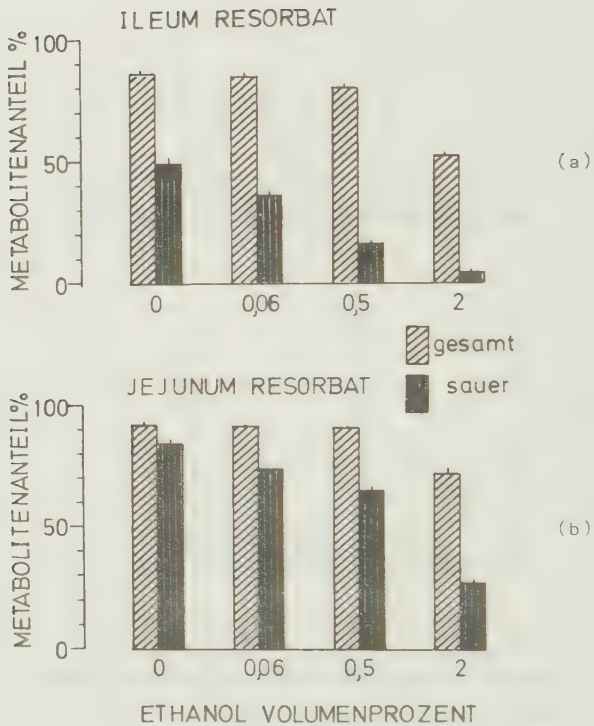


Abb. 11: Anteil der gesamten und der sauren Metaboliten im Resorbat von Ileum- (a) bzw. Jejunumsegmenten (b) nach Perfusion mit ^{14}C -NDBA in Abhängigkeit von verschiedenen Ethanolkonzentrationen. Die Zeichenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung vom Mittelwert von 6-12 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

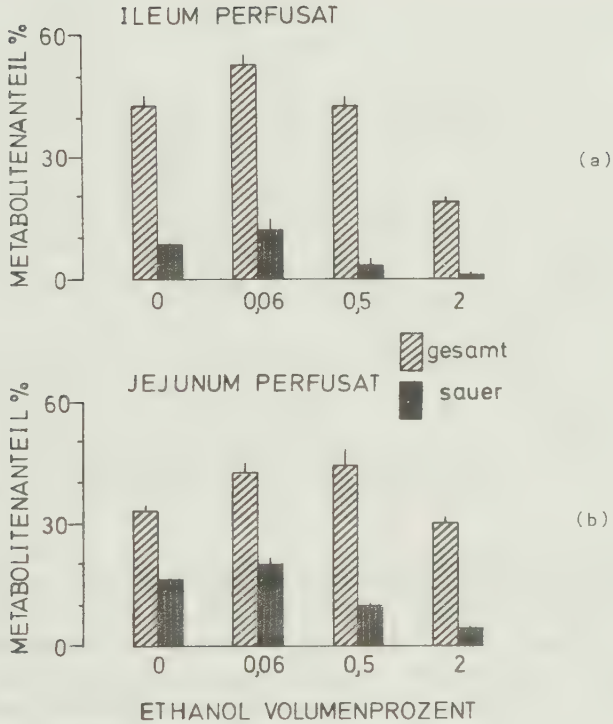


Abb. 12: Anteil der gesamten und der sauren Metaboliten im Perfusat von Ileum- (a) bzw. Jejunumsegmenten (b) nach Perfusion mit ^{14}C -NDBA in Abhängigkeit von verschiedenen Ethanolkonzentrationen. Die Zeichenwerte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung vom Mittelwert von 6-12 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

IV. Diskussion

Die Untersuchungen zum Stoffwechsel von NDBA am Darm gefütterter Ratten ohne Alkoholzusatz und die Analysen der Wechselwirkung zwischen NDBA und Alkohol am Darm sollen unter folgenden Aspekten betrachtet und diskutiert werden:

1. Kritische Betrachtung der Methode - Übertragbarkeit der in vitro-Ergebnisse auf in vivo-Verhältnisse
2. Unterschiede im NDBA-Metabolitenmuster zwischen Jejunum- und Ileumsegmenten
3. Einfluß des Fütterungszustandes auf die Vitalitätskriterien
4. Verstoffwechslung von NDBA in Abhängigkeit vom Fütterungszustand.
5. Einfluß von Ethanol auf die Vitalitätskriterien und
6. Einfluß von Ethanol auf den NDBA-Stoffwechsel

1. Kritische Betrachtung der verwendeten Methode

Isoliert durchströmte, nicht durchblutete Darmsegmente nach der Methode von Fisher und Parsons (42) - modifiziert durch Rummel und Stupp (43) und durch Richter und Strugala (41) - können durch Sauerstoffzufuhr, Luftfeuchtigkeit und Perfusion mit einer Nährlösung hinsichtlich ihrer Stoffwechselleistung mehrere Stunden am Leben erhalten werden. Begünstigt durch den Druck auf der Mucosaseite - er beträgt bei ca. 10 cm langen Darmsegmenten 25 cm Wassersäule - kommt es zu einer leicht meßbaren Resorption von Flüssigkeit, die nach zwei Stunden für das Jejunum ca. 2 ml/10 cm Darm, für das Ileum jedoch nur die Hälfte bis ein Drittel dieses Wertes beträgt. Die Methode ist daher geeignet, von Stoffen die metabolische Umwandlung während ihres Durchtritts durch die Darmwand zu untersuchen. In einem Vorversuch wurde die Integrität der Darmpräparation mit ^{14}C -Inulin, welches die Zellwände nicht penetrieren kann, getestet. Nach 2-stündiger Perfusion wurden durchschnittlich 0,06% der eingesetzten Radioaktivität im Resorbat des Jejunum-

und 0,85% im Resorbat des Ileumsegmentes gefunden. Vergleicht man diese Radioaktivitätsmenge im Resorbat mit der resorbierten Wassermenge (6% bzw. 3,8% der eingesetzten 50 ml), dann ergibt sich, daß bei Jejunumsegmenten max. 1%, bei Ileumsegmenten bis zu 22% des Inulins zusammen mit dem Wasser parazellulär durchgetreten waren. Während somit beim Jejunum die Resorption fast ausschließlich über die Epithelzellen verläuft, ist beim Ileum damit zu rechnen, daß ein nicht unwesentlicher Anteil des resorbierten Wassers - und damit auch der im Wasser gelösten Begleitstoffe - unter Umgehung der Epithelzellen direkt in das Resorbat gelangt. Der Grund dafür könnte in den großen Ansammlungen von mukösen lymphoiden Geweben, den Peyerschen Platten, liegen, mit denen die Ileum-Oberfläche herdförmig versehen ist. Obwohl die Peyerschen Platten hauptsächlich in der Submucosa lokalisiert sind, dehnen sie sich bis in die Mucosa aus und kommen dort in Kontakt mit den darüberliegenden Epithelien (45). Hier könnte es dann im Laufe der Perfusion, vermutlich verstärkt durch den Perfusionsdruck, zu Undichtigkeiten kommen. Bei Anwendung der gewählten Methode ist somit bei Vergleichen zwischen Jejunum- und Ileumsegmenten hinsichtlich der Verstoffwechslung von Fremdstoffen während der Resorption Vorsicht geboten; denn im Gegensatz zum Jejunum könnte beim Ileum ein nicht unbeträchtlicher Teil der unverstoffwechselten Substanz parazellulär, d.h. unter Umgehung der stoffwechselaktiven Epithelien, in das Resorbat gelangt sein.

Da die Darmsegmente nicht durchblutet werden, ist bei der Übertragung der Ergebnisse von *in vitro*- auf *in vivo*-Verhältnisse Zurückhaltung geboten. Nach Coulson und Herbert (46) hängt die Reaktionskinetik in vivo ganz wesentlich von der Durchblutungsgeschwindigkeit ab, während sie in vitro nur von den Parametern einer Enzymkinetik nach Michaelis-Menten, d.h. der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ($V_{\max}$) und der Michaeliskonstanten (K_m), bestimmt wird. Nun stellt die von uns gewählte Versuchsanordnung zwar kein reines in vitro-System in dem Sinne dar, daß kein gerichteter Transport vorhanden wäre. Die Flüssigkeitsbewegung von mukosaler zu serosaler Seite ist jedoch

viel geringer als in durchbluteten Darmsegmenten. Es ist deshalb möglich, daß eine Substanz *in vivo* schneller abtransportiert wird. Versuche mit NDBA in vivo in unserer Arbeitsgruppe (47) haben gezeigt, daß bei einer niedrigen Konzentration (0,1 nmol/ml) die Verstoffwechselungsrate während der Resorption ebenfalls sehr hoch war (85%) (48). Bei einer höheren Konzentration (1,1 nmol) nahm sie aber viel stärker ab (25%), als es aufgrund der Ergebnisse früherer Versuche in vitro (40) zu erwarten war. Daher ist es nur bei niedrigen NDBA-Konzentrationen möglich, die an isoliert durchströmten Darmsegmenten gemessene Verstoffwechselung von NDBA näherungsweise auf *in vivo*-Verhältnisse zu übertragen. Bei der Untersuchung der NDBA-Metabolisierung unter gleichzeitiger Zugabe von Alkohol ins Perfusionsmedium kommt bei der Übertragung der in vitro-Verhältnisse auf in vivo-Bedingungen erschwerend hinzu, daß Alkohol einerseits die Durchblutung am Darm fördert, andererseits mit steigender Durchblutungsgeschwindigkeit selbst besser resorbiert wird (49).

2. Unterschiede im NDBA-Metabolitenmuster zwischen Jejunum- und Ileumsegmenten

Durch Weiterentwicklung der HPLC-Analystechnik (40) mit Hilfe eines Gradientenprogrammes gelang es, die neutralen und sauren Metaboliten des NDBA voneinander zu trennen (Abb. 5). Die saure Metabolitenfraktion besteht hauptsächlich aus N-Nitroso-butyl-(3-carboxypropyl)amin (BCPN), während in der neutralen Metabolitenfraktion N-Nitroso-butyl-(4-hydroxybutyl)-amin (BBN), und N-butyl-N-(3-hydroxybutyl)nitrosamin (BHBN-3) enthalten sind (44). Die Verstoffwechselung durch ω -Oxidation zu BBN und, nach weiterer Autoxidierung, zu BCPN kann als Giftung gewertet werden, da beide Substanzen als selektive, hochwirksame Harnblasencarcinogene gelten (37). Die Metabolisierung über die ω -1-Oxidation zu BHBN-3, die in der Leber *in vitro* überwiegt (36), ist dagegen eher im Sinne einer Entgiftung zu werten (37). Neben der Unterscheidung zwischen saurer und neutraler Metabolitenfraktion wäre deshalb auch die Trennung

von BBN und BHBN-3 wünschenswert gewesen. Dies ist mit der hier entwickelten HPLC-Methode jedoch nicht gelungen. Die beiden Substanzen unterscheiden sich in ihrer Polarität offensichtlich zu wenig, um innerhalb einer vertretbaren Analysenzeit ausreichend voneinander getrennt zu werden, wobei es fraglich ist, ob auf diesem Wege aufgrund des mit der Verlängerung der Laufzeit einhergehenden Verlustes an Trennschärfe überhaupt eine Verbesserung der Trennleistung hätte erreicht werden können. Die Abb. 5b zeigt, daß sich unter optimalen Bedingungen, d.h. bei einer neu gefüllten HPLC-Säule, die Auftrennung der beiden Hydroxide andeutet, wobei der vordere Peak dem BBN, der hintere dem lipophileren BHBN-3 zuzuordnen wäre. Auf eine Auswertung wurde aber verzichtet, weil sich die Trennung nicht reproduzieren ließ, und auch die Auswertung von zwei Produktgipfeln, die nicht zur Basislinie getrennt sind, mit einer hohen Fehlerquote behaftet ist (Abb. 7 - 10).

Beim Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit Jejunum- und Ileumsegmenten von gefütterten und mit Öl vorbehandelten Ratten zeigte sich, neben den bereits in einer früheren Arbeit (40) gesehenen Unterschieden in der Verteilung der Gesamtmetaboliten zwischen Perfusat und Resorbat und CO_2 -absorbierender Waschflasche, eine signifikant höhere Weiterverstoffwechslung zu sauren Metaboliten bei Jejunumsegmenten (Tab. 4,5; Abb. 11,12).

Neben der bereits früher beobachteten signifikant höheren Kapazität der Jejunumsegmente, NDBA am α -C-Atom zu oxidieren, - dies äußert sich in einer ca. 5-fach höheren CO_2 -Produktion (Tab.4) und einer vierfach höheren kovalenten Bindung an Mucosaproteine - können also auch große Unterschiede bei der ω -Oxidation beobachtet werden. Die Frage, ob im Ileum die ω -Oxidation insgesamt oder nur die Oxidierung von BBN zu BCPN verringert wird, kann wegen der fehlenden Differenzierung zwischen BBN und BHBN-3 nicht entschieden werden. Die orientierende Untersuchung der Hydroxidfraktion einer Resorbatprobe aus einem früheren Versuch mit Ileumsegmenten (40) mittels Gaschromatographie unter Verwendung des hochempfindlichen und für

die Nitrosogruppe spezifischen TEA-Detektors hat ergeben, daß ca. dreimal mehr BBN als BBN-3 vorhanden war (48). Weitere Untersuchungen sind nötig, um abzuklären, ob die ω -Oxidation tatsächlich auch beim Ileum der dominierende Stoffwechselweg ist.

3. Einfluß des Fütterungszustandes der Ratten auf die Vitalitätskriterien

Wesentliche Unterschiede wurden nur in der Glucoseaufnahme gesehen. Isoliert perfundierte Jejunumsegmente von nüchternen Ratten reicherten die Glucose stärker an; Ileumsegmente zeigten dagegen die umgekehrte Tendenz (Tab. 1). Die Unterschiede sind nicht allein mit Veränderungen im Wassertransport zu erklären.

4. Verstoffwechslung von NDBA in Abhängigkeit vom Fütterungszustand

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben über den Einfluß des Fütterungszustands auf die Stoffwechselleistungen von Darm und Leber. Während Hoensch (50) bereits nach 24 h Fütterentzug eine Abnahme der Monooxygenase-Aktivität im Dünndarm beobachtete, ließ sich hinsichtlich der NDMA-Demethylierung in der Leber eine Steigerung der Aktivität nachweisen, die auf den Anstieg von beim Fasten entstehender Ketonkörper zurückgeführt werden konnte (11). Die Ketonkörper aktivieren ein bestimmtes Isoenzym des Cytochrom P-450 mit hoher Affinität für die NDMA-Demethylase.

Vergleicht man unsere Ergebnisse über den Stoffwechsel von 2 nmol/ml NDBA am Darm gefütterter Ratten mit den Werten von Richter-Coosberg (40), die bei vergleichbaren NDBA-Konzentrationen mit der gleichen Methode jedoch von nüchternen Tieren erhalten wurden, dann zeigt sich bei der Betrachtung der gesamten Verstoffwechslungskapazität kein wesentlicher Unterschied. Bei nüchternen Ratten betrug die Summe der Metaboliten nach Perfusion mit 3,41 nmol/ml bzw. 2,48 nmol/ml $32,1 \pm 2,0$ % bzw. $36,3 \pm 1,0$ % der Dosis bei Jejunum bzw. Ileumsegmenten; bei ge-

fütterten Ratten wurde nach Perfusion mit 2 nmol/ml $34,2 \pm 1,8 \%$ bzw. $33,1 \pm 3,1 \%$ der Dosis von Jejunum- bzw. Ileumsegmenten verstoffwechselt.

Bei genauerer Betrachtung der Verteilung der Radioaktivität und der Metaboliten fallen jedoch einige Unterschiede auf. Die Resorptionsleistung für die Gesamtradioaktivität war bei den gefütterten Tieren besonders im Jejunum erhöht. Der prozentuale Anteil der Metaboliten im Resorbat von Jejunum und Ileum war erniedrigt, ebenso wie der Gehalt an Radioaktivität in der CO_2 -absorbierenden Waschflasche. Die Jejunumsegmente gefütterter Tiere reicherten im Vergleich mit nüchternen Tieren 1,5 mal mehr Radioaktivität im Resorbat an, während sie gleichzeitig 4 mal mehr Originalsubstanz als bei nüchternen Tieren transportierten. Dies ist durch die höhere Resorptionsrate für die Radioaktivität und durch die verringerte Metabolisierungsrate bei gefütterten Tieren erklärbar, die im Jejunum um ca. 5% und im Ileum um ca. 7% tiefer lag als bei nüchternen Tieren.

Auch in Bezug auf die zu mutagenen Stoffwechselprodukten führende α -Oxidation, bei der auch Kohlendioxid entsteht, waren die Darmsegmente nüchterner Tiere deutlich aktiver. Die Kohlendioxidwerte waren bei Richter-Cooberg (40) etwa doppelt so hoch wie bei unseren Untersuchungen. Dies läßt sich einerseits daraus erklären, daß Richter-Cooberg (40) nur eine Waschflasche vor das CO_2 -absorbierende Methoxyethylamin geschaltet hatte. - In Vorversuchen konnten wir ermitteln, daß ca. 1% der in der ersten Waschflasche enthaltenen Radioaktivität durch diese nicht gebunden wird und somit in der früheren Arbeit ein Übertragungsfehler nicht auszuschließen war, bei dem mehr Radioaktivität dem Kohlendioxid zugeordnet wurde - andererseits läßt sich auch nach Korrektur dieses systematischen Fehlers sowohl für die Jejunum- als auch für die Ileumsegmente bei nüchternen Tieren eine im Vergleich zu gefütterten Tieren erhöhte Verstoffwechslung zu Kohlendioxid abschätzen.

5. Einfluß von Ethanol auf die Vitalitätskriterien

In einem Vorversuch wurden die Därme einer 5%-igen Ethanolkonzentration ohne NDBA ausgesetzt. Im Gegensatz zum Ileum reagierte das Jejunum dabei sehr empfindlich: Die Vitalitätskriterien, aktiver Glucose-, Elektrolyt- und Wassertransport, waren stark vermindert (Tab. 2). Deshalb wurde der Stoffwechsel von NDBA am Darm nur mit niedrigeren Ethanolkonzentrationen (0,06 %, 0,5 %, 2 %) getestet. Sie entsprechen auch eher den Konzentrationen, die man im Darm nach dem Trinken eines alkoholischen Getränkes gemessen hat. So wurde im menschlichen Darm nach dem Genuß von 40 g Ethanol in 10- oder 20-prozentiger Lösung eine 2%-ige Ethanolkonzentration gefunden (51). Bei Jejunumsegmenten, die mit 2%-igem Ethanol durchströmt wurden, zeigte sich noch eine signifikante Hemmung des Glucosetransports, während bei niedrigeren Ethanoldosen eher eine Tendenz zur Steigerung des aktiven Glucosetransports zu erkennen war. Der Natrium- und Wassertransport wurde durch keine der drei untersuchten Ethanolkonzentrationen beeinträchtigt. So konnte die Beobachtung von Leopold et al. (15), daß die Aktivität der $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATP-ase schon durch 1% Ethanol gehemmt wird, erst für höhere Ethanolkonzentrationen (5%) bestätigt werden. Diese Diskrepanz ist möglicherweise durch die Verwendung verschiedener Methoden begründet; Leopold et al. untersuchten den vom Jejunum isolierten Bürstensaum, welcher eventuell empfindlicher reagiert als die nach der Methode von Fisher und Parsons (42) untersuchten intakten Därme.

6. Einfluß von Ethanol auf den NDBA-Stoffwechsel

Betrachtet man den Gesamtstoffwechsel von NDBA in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration, dann zeigt sich wie bei den Vitalitätskriterien erst bei der höchsten Konzentration von 2% eine signifikante Hemmung (Tab.4 und 5), die bei Ileumsegmenten stärker ausgeprägt ist als bei Jejunumsegmenten. Des weiteren fällt auf, daß die CO_2 -Produktion, als Ausdruck der Aktivierung des NDBA über die α -Hydroxylierung, bei der niedrigsten Ethanolkonzentration signifikant gesteigert ist. Eine ge-

wisse Hemmung der CO_2 -Produktion bei höheren Ethanolkonzentrationen war lediglich beim Ileum zu sehen. Dies ist umso erstaunlicher, als in der Literatur bei der gleichzeitigen Gabe von Ethanol und Nitrosamin nur über eine Hemmung der α -Hydroxylierung, selbst bei kleinsten Ethanolkonzentrationen, berichtet wird. In der perfundierten Leber konnten Tomera et al. (52) bereits bei Ethanolzufuhr von weniger als 0,5 mmol, das entspricht 0,003 Volumenprozent, eine Hemmung des Abbaus von N-Nitrosodimethylamin (NDMA) beobachten. Auch in Lebermikrosomen von Ratten (53) und in Leberzellen von Meerschweinchen (54) hemmt der Zusatz von Ethanol die NDMA-Verstoffwechslung in vitro. Gleichzeitige Gaben von Ethanol und Nitrosaminen in vivo lassen ebenfalls den Hemmeffekt von Ethanol auf den Stoffwechsel von Nitrosaminen in der Leber erkennen. So fand man z.B. nach alleiniger oraler Gabe von NDMA bei Ratten weder im Blut noch im Urin die Reinsubstanz wieder; das NDMA wurde im "first-pass" von der Leber vollständig abgebaut. Verabreichte man das NDMA jedoch in einer 5%-igen Ethanollösung, dann konnte unverstoffwechseltes NDMA sowohl im Blut als auch im Urin nachgewiesen werden (55). In Anbetracht dieser Ergebnisse finden möglicherweise auch die widersprüchlichen Aussagen, die man in der Literatur zur Bedeutung der endogenen Bildung von NDMA beim Menschen findet, ihre Erklärung. Während die Arbeitsgruppen von Ellen et al. (56) und Eisenbrand et al. (57) nach Verabreichung von nitratreicher Nahrung im Blut der Versuchspersonen keinen Anstieg der NDMA-Konzentration im Blut nachweisen konnten, fanden Fine et al. (58) erhöhte NDMA-Werte. Nachforschungen ergaben, daß die Probanden im Falle der Untersuchung von Fine et al. Alkohol in Form von Bier, das ja selbst zusätzlich noch NDMA enthalten kann, zu sich genommen hatten. Welch große praktische Bedeutung diese Hemmwirkung des Nitrosaminstoffwechsels in der Leber durch Ethanol zukommen kann, zeigt die Veränderung der Tumorlokalisation bei gleichzeitiger Gabe von Ethanol und Nitrosaminen, die allein gegeben in erster Linie Lebertumoren hervorrufen. NDMA in 40%-iger Ethanollösung erzeugte z.B. bei Mäusen gehäuft Tumoren im Ol-

faktorium, die sonst sehr selten sind (59). Die Kombination von N-Nitrosodiethylamin (NDEA) mit 30%-iger Alkohollösung führte bei Ratten vermehrt zu Ösophaguskrebs (60). Das epidemiologisch beobachtete Auftreten von Ösophaguskrebs in Ländern, in denen der Alkoholkonsum sehr hoch ist, könnte mithin so erklärt werden, daß durch die hemmende Wirkung des Alkohols die cancerogenen Nitrosamine in der Leber nicht mehr so gut verstoffwechselt werden, und somit besonders extrahepatische Gewebe, wie z.B. der Ösophagus (55), stärker den Cancerogenen ausgesetzt werden. Dagegen wiederum sprechen jene Befunde, wonach chronische Behandlung von Ratten mit Ethanol in der Leber in vitro zu einer starken Steigerung des NDMA-Stoffwechsels führt (53). Obwohl der α -Hydroxylierung nicht nur bei NDBA, sondern auch bei anderen Nitrosaminen (40) am Darm insgesamt nur eine geringe Bedeutung zukommt, wäre es deshalb interessant zu untersuchen, ob eine länger dauernde Vorbehandlung der Ratten mit Ethanol auch am Darm diesen Stoffwechselweg steigert.

Die stärksten Veränderungen des intestinalen NDBA-Stoffwechsels durch Ethanol werden im Metabolitenverteilungsmuster gesehen (Abb. 7-12). Bereits bei der niedrigsten Ethanolkonzentration von 0,06 % ist der Anteil der sauren Metaboliten im Resorbat signifikant gehemmt und sinkt dosisabhängig auf ein Drittel (Jejunum) bis auf ein Sechstel (Ileum) der Kontrollwerte (Tab. 5). Im Perfusat ist dieser Effekt erst ab der mittleren Ethanolkonzentration nachzuweisen. Nachdem das Perfusat den größeren Beitrag zur Summe der vom Darm gebildeten Metaboliten liefert, ist deshalb bei der niedrigsten Ethanoldosis auch die Summe der sauren Metaboliten nicht signifikant verschieden von den Kontrollen (Tab. 4). Bei den Ileumsegmenten steigert diese Ethanolkonzentration sogar die Gesamtverstoffwechslung von NDBA auf den mit Abstand höchsten Wert der gesamten Versuchsserie. Neben einer leichten Erhöhung der Produktion von sauren Metaboliten und CO_2 ist dafür in erster Linie die vermehrte Bildung von neutralen Metaboliten verantwortlich.

Aufgrund der fehlenden Differenzierung der verschiedenen möglichen neutralen Metaboliten kann jedoch nicht entschieden werden, ob Ethanol auch zu einer Veränderung des Verhältnisses zwischen ω - und ω -1-Hydroxylierung führt, oder gar der dritte mögliche Abbauweg über die ω -2-Hydroxylierung beeinflusst wird. Wie bereits mehrfach ausgeführt, wäre eine Aussage darüber hinsichtlich der toxikologischen Bedeutung der verschiedenen Stoffwechselwege von großem Interesse. Eisenbrand et al. (61) konnten zeigen, daß der Abbau von N-Nitrosodiethanolamin auch ohne Zusatz von mischfunktionellen Monooxygenasen alleine von der Alkoholdehydrogenase (ADH) bewerkstelligt werden kann. Es wäre deshalb nicht auszuschließen, daß die im Darm zu findende ADH (8) auch für die Oxidierung von BBN zu BCPN verantwortlich ist. Durch Ethanolzusatz in hohem Überschuß im Vergleich zum NDBA könnte dieser Stoffwechselweg dann einer kompetitiven Hemmung unterliegen. In ersten Vorversuchen in der Arbeitsgruppe von Richter (48) gelang es allerdings nicht, BBN durch Zusatz von ADH aus Hefe und NAD in BCPN überzuführen, obwohl es sich bei dieser ADH um die gleiche gehandelt hat, die bei den Versuchen von Eisenbrand et al. (61) verwendet worden war. Die intestinale ADH könnte aber eine andere Substratspezifität besitzen. Ihre Beteiligung an der Hemmung der BCPN-Bildung durch Ethanol kann deshalb noch nicht ausgeschlossen werden. Ob Ethanol überhaupt die Weiterverstoffwechslung von BBN zu BCPN oder aber die Bildung von BBN selbst hemmt und dafür z.B. die ω -1-Hydroxylierung zum BHBN-3 steigert, läßt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht entnehmen. Weitere Untersuchungen mit neuen analytischen Methoden sind notwendig, um die Frage endgültig zu klären.

Unabhängig vom Mechanismus der Ethanolwirkung kann jedoch aus der vorliegenden Arbeit als Konsequenz für den intestinalen first pass-Metabolismus von NDBA festgehalten werden, daß durch gleichzeitige Verabreichung von Ethanol weniger saure Metaboliten in den Körper gelangen, und daß bei der höchsten Dosis von 2 % Ethanol auch insgesamt weniger Metaboliten in den Körper gelangen. Nachdem aber weder bekannt ist, ob nicht

mehr BBN zur Resorption kommt, noch, ob der Stoffwechsel des Darms bei den für die Erzeugung von Tumoren im Versuchstier nötigen NDBA-Dosen überhaupt eine quantitative Rolle spielt, muß die Frage offenbleiben, ob Ethanol, gleichzeitig mit NDBA gegeben, einen Einfluß auf Tumorrates und -lokalisation haben kann. Würde tatsächlich die Bildung von BBN und BCPN in einer für den Gesamtorganismus signifikanten Weise gehemmt, dann könnte es zu einer Verringerung der Incidenz von Blasen-tumoren kommen. Würde gleichzeitig in ähnlicher Weise wie bei anderen Nitrosaminen die α -Hydroxylierung in der Leber ebenfalls durch Ethanol gehemmt, dann könnten andere Organe, in denen NDBA Tumoren erzeugt, wie z.B. der Ösophagus, vermehrt betroffen werden; es könnte also zu einer Verschiebung in der Tumorlokalisation kommen.

Diese zur Zeit noch offenen Fragen lassen sich aber nur in einem Langzeitversuch am intakten Tier klären. Die Ergebnisse solcher Untersuchungen könnten in Anbetracht der niedrigen wirksamen Ethanolkonzentrationen auch für die Beurteilung der Ethanolwirkung auf den Nitrosaminstoffwechsel beim Menschen von praktischer Bedeutung sein. Eine Ethanolkonzentration von 2%, die den Gesamtstoffwechsel von NDBA hemmt, wurde im menschlichen Darm bereits nach Verzehr von 40 g Alkohol gefunden (51). Diese Alkoholmenge ist z.B. in einer halben Flasche Wein oder in einer "Maß" Bier enthalten. Die Aufnahme solcher Mengen zu einer Mahlzeit ist hierzulande durchaus nicht unüblich. Die wesentlich niedrigeren Alkoholkonzentrationen, die bereits zu einer Veränderung des Metabolitenmusters von NDBA geführt haben, werden im menschlichen Darm bereits nach Verzehr viel geringerer Alkoholmengen, z.B. von einem Schluck Bier erreicht, sodaß praktisch bei jedem, der nicht strikter Antialkoholiker ist, mehr oder weniger häufig der intestinale Stoffwechsel von Nitrosaminen durch Alkohol beeinflußt werden könnte.

V. Zusammenfassung

An isoliert perfundierten Jejunum- und Ileumsegmenten weiblicher Ratten wurde der Einfluß des Fütterungszustandes einerseits, sowie der gleichzeitigen Gabe von Ethanol (0,06-2% im Perfusat) andererseits, auf die Verstoffwechslung von 1-¹⁴C-N-Nitrosodibutylamin (¹⁴C-NDBA) untersucht. Kriterien zur Beurteilung des Stoffwechsel waren neben der über Hochdruckflüssigkeitschromatographie ermittelten Verteilung von NDBA und seiner Metaboliten im Perfusat und in der vom Darm resorbierten Flüssigkeit (Resorbat) die ¹⁴C-CO₂-Bildung und die Bindung von Radioaktivität an Mucosaproteine. Als Vitalitätskriterien der Darmsegmente dienten Glucose-, Natrium- und Wassertransport.

Die wesentlichsten Ergebnisse können - wie folgt - zusammengefaßt werden:

1. Die Jejunumsegmente nüchterner Tiere reicherten die Glucose stärker an als die von gefütterten.
2. Zusatz von Ethanol in Konzentrationen von >2% zur Perfusionslösung war für das Jejunum toxisch.
3. Beim Vergleich des NDBA-Stoffwechsels in Jejunum- und Ileumsegmenten fallen zwei wesentliche Unterschiede auf:
 - Das Jejunum oxidiert das bei der ω -Oxidation zuerst entstehende neutrale N-Nitroso-butyl(4-hydroxybutyl)amin (BBN) größtenteils zu sauren Metaboliten auf, während beim Ileum die neutrale Metabolitenfraktion den Hauptanteil ausmacht.
 - Der quantitativ weniger bedeutsame Abbauweg über die α -Hydroxylierung zu CO₂ und kovalent gebundenen Metaboliten im Darmgewebe ist bei Jejunumsegmenten wesentlich stärker ausgeprägt als bei Ileumsegmenten.

4. Zwischen gefütterten und nüchternen Ratten bestanden hinsichtlich der Verstoffwechslungskapazität keine Unterschiede. Die Resorptionsrate für die Gesamtradioaktivität war bei Jejunumsegmenten von gefütterten Tieren höher, der prozentuale Anteil der Metaboliten in Resorbat und Perfusat und die Rate der α -Hydroxylierung dagegen erniedrigt.
5. Mit steigenden Ethanolkonzentrationen im Perfusat reicher-ten Jejunum- und Ileumsegmente immer weniger Radioaktivität und Metaboliten im Resorbat an.
Die Gesamtverstoffwechslung von NDBA sank bei der höchsten Ethanolkonzentration (2%) sehr stark ab, während sie durch niedrigere Ethanolkonzentrationen (0,06% und 0,5%) nicht beeinflußt wurde.
Die α -Oxidation war bei der niedrigsten Ethanolkonzentration (0,06%) bei beiden Darmsegmenten gesteigert. Bei höheren Ethanolkonzentrationen (0,5% und 2%) konnte beim Ileum eine Hemmung festgestellt werden.
6. Die Verteilung der Metaboliten zwischen neutraler und saurer Fraktion war bereits durch die geringste Ethanolkonzentration signifikant zugunsten der neutralen Metaboliten verschoben. Diese Hemmung der Weiterverstoffwechslung von neutralen Metaboliten, in erster Linie wohl N-Nitroso-butyl-(4-hydroxybutyl)amin (BBN), zu sauren Metaboliten - Hauptvertreter ist das N-Nitroso-butyl-(3-carboxypropyl)-amin (BCPN) -, verstärkt sich proportional zur Ethanolkonzentration, so daß im Resorbat der Anteil der sauren Metaboliten von 92% (Jejunum) bzw. 57% (Ileum) auf 37% bzw. 9% absank.
7. Die Hemmung der Entstehung des in vivo wichtigsten ω -Oxidationsprodukts, BCPN, welches für die Auslösung von Harnblasentumoren verantwortlich gemacht wird, durch Ethanol, könnte zu einer Veränderung in der Organotropie der Tumoren bei gleichzeitiger Verabreichung von NDBA und Ethanol führen.

Summary

Inhibition of the intestinal metabolism of dibutyl nitrosamine by ethanol in the rat

The influence of the nutritional state as well as the effect of simultaneous administration of ethanol (0,06-2% in perfusate) on the turnover of 1-¹⁴C-N-Nitrosodibutylamine (¹⁴C-NDBA) has been examined in isolated perfused segments from the jejunum and ileum of female rats.

After two hours of perfusion the distribution of NDBA and its metabolites in the perfusate as well as in the absorbed fluid (absorbate) was determined by means of HPLC. Additionally the formation of ¹⁴C-CO₂ and the binding of radioactivity on the mucosal proteins were measured. The transport of glucose, sodium and water were taken as parameters to control the viability of the intestinal segments.

The results can be summarized as follows:

1. The uptake of glucose was enhanced in jejunal segments of fasting animals as compared to fed animals.
2. The addition of ethanol to the perfusate in concentrations exceeding 2% impaired the transport of glucose, sodium and water by jejunal segments.
3. Two main differences could be observed in the metabolism of NDBA by jejunal and ileal segments, respectively.
 - In jejunal segments a higher rate of oxidation of neutral metabolites, mainly N-nitroso-butyl-(4-hydroxybutyl)amin (BBN), to acidic metabolites, mainly N-nitroso-butyl-(3-carboxypropyl)amin (BCPN) could be observed. In ileal segments neutral metabolites constituted the major part of total metabolites.

- the minor pathway, α -hydroxylation, leading to $^{14}\text{C-CO}_2$ and covalently bound radioactivity in the intestinal tissue was considerably more important in jejunal as compared to ileal segments.
4. The overall metabolism of NDBA was not different between fed and fasted rats. However the absorption of total radioactivity was higher in jejunal segments of fed animals, whereas the percentage of the metabolites in perfusate and absorbate as well as the rate of α -hydroxylation were lowered.
 5. The increase of ethanol concentration in the perfusate resulted in a decreased accumulation of radioactivity and metabolites in the absorbate of jejunal and ileal segments. The total turnover of NDBA was strongly reduced at an ethanol concentration of 2%, while it was not influenced at lower concentrations (0,06% and 0,5%).
An increased α -oxidation could be observed at the lowest ethanol concentration (0,06%) with both intestinal segments. At higher concentrations (0,5% and 2%) there was an inhibition to be seen in ileal segments.
 6. Even at the smallest ethanol concentration the distribution of the metabolites between the neutral and acidic fractions is shifted significantly in favour of the neutral metabolites. The inhibition of the oxidation of neutral metabolites to acidic metabolites increased proportionally to the ethanol concentration up to 40% and 16% of control values in jejunal and ileal segments, respectively.
 7. The decreased formation of BCPN, the most important product of ω -oxidation in vivo, BCPN, which is considered to be responsible for urinary bladder tumors, in the presence of ethanol could lead to a change in the organotropy of tumors after synchronous administration of ethanol and NDBA.

VI. Literaturverzeichnis

1. Preußmann, R.:
Umweltcancerogene unter besonderer Berücksichtigung von Nitrosaminen
Öff. Gesundh.-Wesen 42, 529-535 (1980)
2. Richter, E., X. Feng und M. Wiessler:
Biotransformation of symmetric dialkyl nitrosamines in the rat intestine
Biochem. Pharmacol. 34, 445-446 (1985)
3. Doll, R., und R. Peto:
The causes of cancer
J. Natl. Cancer Inst. 66, 1191-1308 (1981)
4. Wynder, E.L., und I.J. Bross:
A study of etiological factors in cancer of the oesophagus
Cancer 14, 389-413 (1977)
5. Schmähel, D.I., C.W. Sattler und G.F. Scheld:
Experimentelle Untersuchungen zur Syncarcinogenese
Z. Krebsforsch. 66, 526-532 (1965)
6. Schwarz, M., A. Buschmann, G. Wisbeck und W. Kunz:
Effect of ethanol on early stages in nitrosamine carcinogenesis in rat liver
Cancer Letters 20, 305-312 (1983)
7. Henschler, D.:
Alkohole, pp. 618-623 in:
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Herausgegeben von Forth, W., D. Henschler und W. Rummel
3. Auflage, Wissenschaftsverlag, Mannheim (1980)
8. Lamboeuf, Y., G. de Saint Blanquat und R. Derache:
Mucosal alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase-mediated ethanol oxidation in the digestive tract of the rat
Biochem. Pharmacol. 30, 542-545 (1981)

9. Gadeholt, G., und J. Morland:
Ethanol-induced increase in NADH-dependent monooxygenase activities of hepatic microsomal cytochrome P-450
Alcohol 1, 119-124 (1984)
10. Ohnishi, K., und C.S. Lieber:
Reconstitution of the microsomal ethanol oxidizing system (MEOS), qualitative changes of cytochrom P-450 after chronic ethanol consumption
J. Biol. Chem. 252, 7124-7131 (1977)
11. Miller, K.W., und C.S. Yang:
Studies on the mechanisms of induction of N-nitrosodimethylamine demethylase by fasting, acetone and ethanol
Arch. Biochem. Biophys. 229, 483-491 (1984)
12. Ullrich, V., P. Weber und P. Wollenberg:
Tetrahydrofurane - an inhibitor for ethanol - induced liver microsomal cytochrome P-450
Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 1061-1066 (1978)
13. Seitz, H.K., A.J. Garro und C.S. Lieber:
Effect of chronic ethanol ingestion on intestinal metabolism and mutagenicity of benz(a)pyrene
Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 1061-1066 (1978)
14. Soehring, K., und R. Schüppel:
Wechselwirkungen zwischen Alkohol und Arzneimitteln
Dtsch. med. Wschr. 91, 1892-1895 (1966)
15. Leopold, G., E. Furukawa, W. Forth und W. Rummel:
Binding of cardiac glycosides to isolated jejunal brush borders from rat and guinea pig and their influence on membrane phosphatase systems
Biochem. Pharmacol. 20, 1119-1122 (1971)
16. Spencer, R.P., K.R. Brody und B.M. Lutters:
Some effects of ethanol on the gastrointestinal tract
Am. J. Dig. Dis. 9, 599-604 (1964)

17. Chang, T., J. Lewis und A.J. Glazko:
Effect of ethanol and other alcohols on the transport of
amino acids and glucose by everted sacs of small intestine
Biochim. Biophys. Acta 135, 1000-1007 (1967)
18. Hoensch, H.P., und F. Hartmann:
The intestinal enzymatic biotransformation system,
Potential role in protection from colon cancer
Hepato-gastroenterol. 28, 221-228 (1981)
19. Gibaldi, M., und D. Perrier:
Route of administration and drug disposition
Drug Metabolism Review 3, 185-199 (1974)
20. Strugala, G., und A.G. Rauws:
Metabolic transformation of amygdalin into prunasin in rat
intestine "in vitro"
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 321, R33 (1982)
21. Wattenberg, L.W.:
Dietary modification of intestinal and pulmonary aryl-
hydrocarbon hydroxylase activity
Toxicol. Appl. Pharmacol. 23, 741-747 (1972)
22. Mulder, G.J., S. Brouwer und E. Schalters:
High-rate intestinal conjugation of 4-methyl-umbelliferone
during intravenous infusion in the rat in vivo
Biochem. Pharmacol. 33, 2341-2344 (1984)
23. Remmer, H.:
The role of the liver in drug metabolism
Amer. J. Med. 49, 617-629 (1970)
24. Borm, P.J.A.:
Oxidative drug metabolism in the rat gut wall in vitro.
Correlation with in vivo data
Diss. rer.nat. Utrecht (1983)

25. Klippert, P.J.M.:
Oxidative drug metabolism in the gut wall in vivo.
Its role in bioavailability
Diss. rer. nat., Utrecht (1983)
26. Stohs, S.J., R.C. Grafström, M.D. Burke, P.W. Moldeus und
S.G. Orrenius:
The isolation of rat intestinal microsomes with stable
cytochrome P-450 and their metabolism of benzo(a)pyrene
Arch. Biochem. Biophys. 177, 105-116 (1976)
27. Moldeus, P., B. Andersson und A. Norling:
Interaction of ethanol oxidation with glucuronidation in
isolated hepatocytes
Biochem. Pharmacol. 27, 2583-2588 (1978)
28. Koster, A.Sj., C.P.J. Meewisse und J. Noordhoek:
Glucuronidation in rat intestinal epithelial cells.
Dependence of glucose supply and resistance to inhibition
by ethanol and fasting
Arch. Toxicol. 55, 123-126 (1984)
29. Schmährl, D., und M. Habs:
Carcinogenicity of N-nitroso compounds.
Species and route differences in regard to organotropism
Oncology 37, 237-242 (1980)
30. Eisenbrand, G.:
N-Nitrosoverbindungen in Nahrung und Umwelt:
Eigenschaften, Bildungswege, Nachweisverfahren und Vor-
kommen
Wiss. Verlagsges. m.b.H., Stuttgart (1981)
31. Havery, D.C., und T. Fazio :
Survey of baby bottle rubber nipples for volatile
N-nitrosamines
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66, 1500-1503 (1983)

32. Österdahl, B.-G.:
N-Nitrosamines and nitrosatable compounds in rubber
nipples and pacifiers
Food Chem. Toxicol. 21, 755-757 (1983)
33. Spiegelhalder, B., und R. Preußmann:
Occupational nitrosamine exposure. 1. Rubber and tyre
industry
Carcinogenesis 4, 1147-1152 (1983)
34. Druckrey, H., R. Preußmann, S. Ivancovic und D. Schmähel:
Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen
N-Nitroso-Verbindungen an BD Ratten
Z. Krebsforsch 69, 103-201 (1967)
35. Suzuki, E., T. Anjo, J. Aoki und M. Okada:
Species variations in the metabolism of N-butyl-N-
(4-hydroxybutyl)nitrosamine and related compounds in
relation to urinary bladder carcinogenesis
Gann 74, 60-68 (1983)
36. Suzuki, E., M. Mochizuki, K. Shibuya und M. Okada:
N,N-Dibutylnitrosamine metabolism by rat liver S9 fraktion
and oxidation by chemical model systems
Gann 74, 41-50 (1983)
37. Okada, M., und M. Ishidate:
Metabolic fate of N-n-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine
and its analogues. Selective induction of urinary bladder
tumours in the rat
Xenobiotica 7, 11-24 (1977)
38. Suzuki, E., und M. Okada:
Metabolic fate of N,N-dibutylnitrosamine in the rat
Gann 71, 863-870 (1980)
39. Suzuki, E., M. Mochizuki, Y. Wakabayashi und M. Okada:
In vitro metabolic activation of N,N-dibutylnitrosamine
in mutagenesis
Gann 74, 51-59 (1983)

40. Richter-Cooberg, U.:
Resorption und Metabolismus von Dialkylnitrosaminen am
Rattendarm in vitro
Diss. med. vet. München (1984)
41. Richter, E., und G.J. Strugala:
All-glass perfusator for investigation on the intestinal
transport and metabolism of foreign compounds in vitro
J. Pharmacol. Meth., in press (1985)
42. Fisher, R.B., und D.S. Parsons:
A preparation of surviving rat small intestine for the
study of absorption
J. Physiol. (London) 110, 26-46 (1949)
43. Rummel, W., und H.F. Stupp:
Der Einfluß von Kalium und Calcium auf die Salz-, Glucose-
und Wasserresorption des isolierten Dünndarms
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 240, 79-92 (1960)
44. Zwickenkflug, W.:
Metabolismus von N,N-Dibutylnitrosamin im Rattendarm
Diplomarbeit der Chemie, München (1984)
45. Owen, R.L., und A.L. Jones:
Epithel cell specialization within human Peyer's patches:
An ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles
Gastroenterol. 66, 189-203 (1974)
46. Coulson, R.A., und J.D. Herbert:
Reaction velocities in vivo: standardization of kinetic
"constants" by correction for blood flow
Chem. Biol. Interact. 34, 209-221 (1981)
47. Richter, E., und X.C. Feng:
First pass metabolism of N-nitrosodibutylamine (NDBA) in
autoperfused rat intestinal segments
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., in press (1985)
48. Richter, E.:
Persönliche Mitteilung (1985)

49. Winne, D., und J. Remischovsky:
Der Einfluß der Durchblutung auf die Resorption von Harnstoff, Methanol und Äthanol aus dem Jejunum der Ratte
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 268, 392-416 (1971)
50. Hoensch, H.:
Fremdstoffabbauende Enzyme im Dünndarm und in der Leber von Mensch und Ratte, Einfluß von Nahrungsfaktoren und verschiedenen Krankheitsbildern.
Habilitationsschrift der med. Fakultät der Universität Tübingen (1979)
51. Forth, W., und W. Rummel:
Alcohols and anesthetics
aus Int. Encyclop. Pharmacol. Ther.
Pharmacol. Intestinal Absorption 39 B I, 185-188 (1975)
52. Tomera, J.F., P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum und H. Brunnengraber:
Inhibition of N-nitrosodimethylamine metabolism by ethanol and other inhibitors in the isolated perfused rat liver
Carcinogenesis 5, 113-116 (1984)
53. Schwarz, M., K.E. Appel, D. Schrenk und W. Kunz:
Effect of ethanol on microsomal metabolism of dimethylnitrosamine
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 97, 233-240 (1980)
54. Hauber, G., R. Frommberger, H. Remmer und M. Schwenk:
Metabolism of low concentrations of N-nitrosodimethylamine in isolated liver cells of the guinea pig
Cancer Res. 44, 1343-1346 (1984)
55. Swann, P.F., A.M. Coe und R. Mace:
Ethanol and dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine metabolism and disposition in the rat. Possible relevance to the influence of ethanol on human cancer incidence
Carcinogenesis 5, 1337-1343 (1984)

56. Ellen, G., P.L. Schuller, P.G.A.M. Froeling und E. Bruijns:
No volatile N-nitrosamines detected in blood and urine from patients ingesting daily large amounts of ammonium nitrate
Food Chem. Toxicol. 20, 879-882 (1982)
57. Eisenbrand, G., B. Spiegelhalder und R. Preussmann:
Analysis of human biological specimens for nitrosamine contents
in Bruce, W.R., P. Correa, M. Lipkin und S.R. Tannenbaum (eds.),
Gastrointestinal Cancer: Endogenous Factors, Cold Spring Harbor Press, NY, Banbury Report, 7, 275-283 (1981)
58. Fine, D.H., R. Ross, D.P. Rounbehler, A. Silvergleid und L. Song:
Formation in vivo of volatile N-nitrosamines in man after ingestion of cooked bacon and spinach
Nature 265, 753-755 (1977)
59. Griciute, L., M. Castegnaro und J.-C. Bereziat:
Influence of ethyl alcohol on carcinogenesis with N-nitrosodimethylamine
Cancer Letters 13, 346-352 (1981)
60. Gibel, W.:
Experimentelle Untersuchungen zur Syncarcinogenese beim Ösophaguskarzinom
Arch. Geschwulstforsch. 30, 181-189 (1967)
61. Eisenbrand, G., E. Denkel und B. Pool:
Alcoholdehydrogenase as an activating enzyme for N-Nitrosodiethanolamine (NDELA): in vitro activation of NDELA to a potent mutagen in Salmonella typhimurium
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 108, 76-80 (1984)

Abschließend möchte ich Herrn Professor Dr.W. Forth für die Überlassung des Themas danken.

Ferner danke ich Herrn Professor Dr.K. Tempel für die Durchsicht der Arbeit und die wohlwollende Beratung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr.E. Richter für seine Unterstützung und seinen wertvollen Rat bei der Durchführung dieser Arbeit.

Meiner Kollegin U. Federsel danke ich für ihre gute Mitarbeit bei der technischen Durchführung der Experimente.

Bei Herrn Privatdozent Dr.M. Wiessler vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg bedanke ich mich für die Synthese von markiertem Dibutylnitrosamin.

Lebenslauf

Jutta Carola Neiss

11.08.1959	geboren in Berlin-Wilmersdorf; Eltern: Prof.Dr.med. Axel Neiss und Dr.med.Ilse Neiss, geb. Bautz
1965-1969	Grundschule in Erlangen
1969-1978	Humanistisches Gymnasium in Erlangen
29.06.1978	Abitur am Gymnasium Fridericianum Erlangen
1978-1984	Studium der Tiermedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität München
Sept. 1981	Erster Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung
Aug. 1982	Zweiter Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung
09.02.1984	Dritter Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung
16.03.1984	Approbation als Tierärztin
seit März 1984	Promotionsstudium

D. GRÄBNER

Dissertations- u. Offsetdruckerei

Gotenstraße 3

8602 Altendorf bei Bamberg

Telefon 09545 / 8791

